

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. Juli 2004 (01.07.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/055176 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 9/10,
A61K 35/00, C12N 5/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/014079

(22) Internationales Anmeldedatum:
11. Dezember 2003 (11.12.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 58 400.1 13. Dezember 2002 (13.12.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): N.V. NUTRICIA [NL/NL]; Eerste Stationsstraat 186,
NL-2712 HM Zoetermeer H.M. (NL).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHMITT, Joachim
[DE/DE]; Aschaffstr. 10, 63768 Hösbach (DE). BOEHM,
Günter [DE/DE]; Haselheckstr. 3, 61209 Echzell (DE).
STAHL, Bernd [DE/DE]; Breslauer Str. 7, 61191 Ros-
bach (DE). SCHAUER, Roland [DE/DE]; Klausdorfer

Str. 38, 24161 Altenholz (DE). TIRALONGO, Evelin
[DE/DE]; c/o Dr. Wolfgang Raudies, Karl-Millöcker-Str.
13, 17033 Neubrandenburg (DE). SCHRADER, Silke
[DE/DE]; Grödeweg 17, 24107 Kiel (DE).

(74) Anwälte: KÖSTER, Hajo usw.; c/o propindus Paten-
tanwälte, Niedmers Jaeger Köster, Pippinplatz 4a, 82131
Gauting (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AL, AU, CA, CN, ID, JP,
LT, LV, MK, NZ, RU, US.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,
HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 26. Mai 2005

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: TRANS-SIALIDASES OBTAINED FROM *TRYPANOSOMA CONGOLENSE*

(54) Bezeichnung: TRANS-SIALIDASEN AUS *TRYPANOSOMA CONGOLENSE*

(57) Abstract: The invention relates to novel enzymes, which transfer sialic acid from a donor molecule onto an acceptor molecule (trans-sialidases). The enzymes are isolated from the protozoan *Trypanosoma congolense*. The invention also relates to functional equivalents of said enzymes, to the nucleic acid sequences and amino acid sequences that code for the enzymes and their functional equivalents, to expression constructs and vectors that contain said sequences, to recombinant microorganisms that carry the inventive coding nucleic-acid sequences, to a method for the recombinant production of the inventive enzymes, to a method for isolating said enzyme from *Trypanosoma congolense*, to a method for the enzymatic sialization of acceptor molecules using the inventive enzymes, to effectors of the inventive trans-sialidases, to the use of the nucleic acid sequences, amino acid sequences, enzymes, effectors or sialization products for producing vaccines, medicaments, foodstuffs or food additives, in addition to the latter products obtained by the inventive method.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft neuartige Enzyme, die Sialinsäuren von einem Donormolekül auf ein Akzeptormolekül übertragen (Trans-Sialidasen). Die Enzyme wurden aus dem Einzeller *Trypanosoma congolense* isoliert. Weiterhin betrifft die Erfindung funktionale Äquivalente dieser Enzyme; die für diese Enzyme und deren funktionalen Äquivalente kodierenden Nukleinsäuresequenzen und Aminosäuresequenzen; Expressionskonstrukte und Vektoren, welche diese Sequenzen enthalten; rekombinante Mikroorganismen welche eine erfindungsgemäße kodierende Nukleinsäuresequenz tragen; Verfahren zur rekombinanten Herstellung erfindungsgemäßer Enzyme; Verfahren zur Isolierung erfindungsgemäßer Enzyme aus *Trypanosoma congolense*; Verfahren zur enzymatischen Sialisierung von Akzeptormolekülen unter Verwendung erfindungsgemäßer Enzyme; Effektoren der erfindungsgemäßen Trans-Sialidasen; die Verwendung erfindungsgemäßer Nukleinsäuresequenzen, Aminosäuresequenzen, Enzyme, Effektoren oder Sialisierungsprodukte zur Herstellung von Impfstoffen, Medikamenten, Nahrungsmitteln oder Nahrungsergänzungsmitteln; sowie die erfindungsgemäß hergestellten Mittel selbst.

WO 2004/055176 A3

Titel: Trans-Sialidasen aus *Trypanosoma congolense***Gegenstand der Erfindung**

Die Erfindung betrifft neuartige Enzyme, die Sialinsäuren von einem Donormolekül (z. B. Oligosaccharide, Polysialinsäuren, glykosylierte Proteine, glykosylierte Peptide, glykosylierte Lipide (z.B. Ganglioside) und andere glykosylierte nieder- und hochmolekulare Moleküle) auf ein Akzeptormolekül (z. B. Oligo- und Polysaccharide, glykosylierte Proteine, glykosylierte Peptide, glykosylierte Lipide und andere glykosylierte nieder und hochmolekulare Moleküle) übertragen (Trans-Sialidasen). Die Enzyme wurden aus dem Einzeller *Trypanosoma congolense* isoliert.

Weiterhin betrifft die Erfindung funktionale Äquivalente dieser Enzyme; die für diese Enzyme und deren funktionalen Äquivalente kodierenden Nukleinsäuresequenzen; Expressionskonstrukte und Vektoren, welche diese Sequenzen enthalten; rekombinante Mikroorganismen, welche eine erfindungsgemäße kodierende Nukleinsäuresequenz tragen; Verfahren zur rekombinanten Herstellung erfindungsgemäßer Enzyme; Verfahren zur Isolierung erfindungsgemäßer Enzyme aus *Trypanosoma congolense*; Verfahren zur enzymatischen Sialisierung von Akzeptormolekülen unter Verwendung erfindungsgemäßer Enzyme; Effektoren der erfindungsgemäßen Trans-Sialidasen; die Verwendung erfindungsgemäßer Nukleinsäuresequenzen, Enzyme, Effektoren oder Sialisierungsprodukte zur Herstellung von Impfstoffen, Medikamenten, Nahrungs- oder Nahrungsergänzungsmitteln; sowie die erfindungsgemäß hergestellten Mittel selbst.

Hintergrund der Erfindung

Trans-Sialidasen können Sialinsäuren, bevorzugt alpha-2,3-gebundene Sialinsäuren, von einem Donormolekül auf ein Akzeptormolekül übertragen, wobei wiederum alpha-2,3-glykosidische Bindungen, bevorzugt an einem β -terminalen Galaktoserest, ausgebildet werden.

Unter dem Begriff Sialinsäuren werden alle N- und O- Derivate der Neuraminsäure zusammengefasst (Blix *et al.*, 1957). Die Neuraminsäure (5-Amino-3,5-didesoxy-D-glycero-D-galacto-nonulo-pyranosonsäure) ist ein Aminozucker mit einem Rückgrat aus neun Kohlenstoffatomen, der durch die Carboxylgruppe am C-Atom 2 einen

stark sauren pK-Wert von 2,2 erhält und daher unter physiologischen Bedingungen negativ geladen ist. Die unsubstituierte Form ist sehr instabil und kommt in der Natur in freier Form nicht vor (Schauer, 1982). Allerdings sind inzwischen mehr als 40 natürliche Derivate der Neuraminsäure bekannt (Schauer und Kamerling, 1997). Die
5 beiden häufigsten in der Natur vorkommenden Sialinsäuren sind die *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), der Vorläufer aller glykosidisch gebundenen Sialinsäuren (Schauer, 1991) und die *N*-Glykolylnneuraminsäure (Neu5Gc), die durch Hydroxylierung der Methylgruppe des *N*-Acetylrestes von CMP-Neu5Ac entsteht (Shaw und Schauer, 1988). Die Hydroxylgruppen dieser beiden Sialinsäuren können
10 durch Acetyl-, Lactyl-, Methyl-, Sulfat- und Phosphatreste in unterschiedlicher Kombination substituiert sein, was zu der großen strukturellen Vielfalt der Sialinsäuren führt (Schauer, 1991; Schauer und Kamerling, 1997).

Der größte Teil der natürlich vorkommenden Sialinsäuren liegt gebunden als
15 Bestandteil von Oligosacchariden, Polysacchariden und insbesondere Glykokonjugaten vor (Schauer, 1982). Es sind aber auch schon Polysialinsäuren aus transgener mikrobieller Produktion bekannt. Sialylierte Glykokonjugate kommen vor allem in der äußeren Membran der Zellen vor, sind jedoch auch wichtige Bestandteile des Serums und von mukösen Schleimen (Traving und Schauer, 1998).
20 Die Sialinsäuren schützen Glykoproteine und Zellen vor dem Angriff durch Proteasen und anderen Enzymen und damit vor dem Abbau (Reuter *et al.*, 1988). Die sialinsäurehaltigen Schleimhäute des Magen-Darmtraktes bilden nicht nur einen wirksamen Schutz vor den Verdauungsenzymen, sondern schützen die darunter liegenden Gewebe auch vor dem Eindringen pathogener Bakterien (Kelm und
25 Schauer, 1997).

Eine sehr wichtige Funktion üben Sialinsäuren bei molekularen und zellulären Erkennungsprozessen aus. Dabei maskieren sie Rezeptoren und verhindern so Interaktionen zwischen Rezeptoren und Liganden (Schauer, 1985; Kelm und
30 Schauer, 1997). So schützen Sialinsäuren z. B. Serumglykoproteine und Erythrozyten vor Abbau und Phagozytose, indem sie darunterliegende Galaktosereste maskieren. Werden die endständigen Sialinsäuren abgespalten,

können die subterminalen Galaktosereste durch Lektine auf Hepatozyten bzw. Phagozyten gebunden werden und es kommt zur Endozytose der Serumproteine bzw. Erythrozyten. Ein weiteres Beispiel ist der Schutz körpereigener Gewebe, aber auch vieler hochsialylierter Tumore vor der Erkennung durch das Immunsystem (Pilatte *et al.*, 1993). Geht die schützende Sialinsäureschicht verloren, kann es zu Autoimmunreaktionen kommen.

Sialinsäuren dienen auch als Erkennungsstellen für körpereigene Zellen und Hormone und spielen so eine wichtige Rolle bei zellulären Interaktionen (Kelm und Schauer, 1997). Bei Entzündungen etwa exprimieren Endothelzellen auf ihrer Oberfläche Selektine, die bestimmte sialylierte Strukturen (z. B. Sialyl-Lewis X) auf Leukozyten erkennen, so dass diese an die Endothelzellen binden und in das Gewebe eindringen können (Lasky, 1995). Außerdem wird die Aktivierung der T-Zellen der humoralen Immunabwehr durch die Wirkung von Trans-Sialidasen beeinflusst (Gao *et al.*, 2001). Sialoadhäsine (Siglecs) wie das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG) binden ebenfalls hochspezifisch an sialylierte Glykane (Kelm *et al.*, 1996; Crocker *et al.*, 1998). Das Myelin-assoziierte Glykoprotein ist im Nervensystem unter anderem an der Myelinisierung und an der Regulation des axonalen Wachstums beteiligt. Somit ist es nicht verwunderlich, dass jüngst festgestellt wurde, dass Trans-Sialidasen durch die Übertragung von Sialinsäuren an der Differenzierung von Nervenzellen und Gliazellen beteiligt sind (Chuenkova *et al.*, 2001). CD-22 ist ein weiterer Sialinsäure-bindender Rezeptor, der auf Lymphozyten vorkommt und das "Zwiesgespräch" von T- und B-Lymphozyten ermöglicht. Die Familie der Siglecs besteht mittlerweile aus über 10 molekularbiologisch charakterisierten Vertretern.

Sialinsäuren sind jedoch nicht nur bei körpereigenen Erkennungsprozessen wichtig, sondern stellen auch Rezeptoren für einige Bakterien, Viren und Toxine dar. So erfolgt z. B. die Bindung des Tetanus-Toxins an Ganglioside von Nervensynapsen über Sialinsäuren (Schauer *et al.*, 1995). Die Sialinsäure-spezifische Adhäsion über mikrobielle Lektine (Sharon und Lis, 1997) ist oft ein kritischer Schritt bei Infektionskrankheiten, etwa bei der durch einige *E. coli*-Stämme hervorgerufenen

Neugeborenen-Meningitis oder bei Infektionen der Magenschleimhaut durch *Helicobacter pylori*. Vor allem die Grippeerreger Influenza A und B Viren docken über Sialinsäure an die zu infizierenden Zellen an (Schauer, 2000).

5 Modifikationen der Sialinsäuren, insbesondere die O-Acetylierung, besitzen eine große Bedeutung bei der Regulation der molekularen und zellulären Erkennung (Schauer, 1991). So binden Influenza C-Viren spezifisch an 9-O-acetylierte Sialinsäuren auf Bronchialepithelien (Herrler *et al.*, 1985), während die O-Acetylierung eine Bindung von Influenza A- und B-Viren verhindert (Higa *et al.*,
10 1985). Vor allem aber ist die O-Acetylierung von Sialinsäuren sehr wichtig für die Morphogenese und Entwicklung verschiedener Gewebe (Varki *et al.*, 1991). Bei neuroektodermalen Tumoren ist sie erhöht (Hubl *et al.*, 2000; Fahr und Schauer, 2001) und bei Dickdarmkrebs erniedrigt (Corfield *et al.*, 1999). Sialinsäuren sind essentielle Modulatoren des biologischen Verhaltens von Tumoren (Schauer, 2000).

15 Figurenbeschreibung

Bild 1 zeigt einen Vergleich der von Aminosäureteilsequenzen der erfindungsgemäßen Trans-Sialidasen TS1 und TS2. Identische Aminosäuren in
20 beiden Sequenzen sind dunkel markiert. Die Übereinstimmung (Identität) der beiden Teilsequenzen beträgt nur etwa 50%.

Bild 2 zeigt die verschiedenen Reaktionsweisen von Sialidase, Sialyltransferasen und Trans-Sialidasen

25 Bild 3 zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenz der Sialidase aus *Trypanosoma rangeli* (T. r. S), der Trans-Sialidase von *Trypanosoma cruzi* (T. cr. TS) und der Trans-Sialidase von *Trypanosoma brucei brucei* (T. b. br. TS) mit Teilsequenzen der beiden erfindungsgemäßen Trans-Sialidasen aus *Trypanosoma congolense* (T. con. TS1 und T. con. TS2). Aminosäuren, die in allen Sequenzen identisch sind, sind
30 weiß auf dunkelgrauem Hintergrund dargestellt. Aminosäuren, die in mindestens 4 von den 5 Sequenzen identisch sind, sind schwarz auf Dunkelgrau gedruckt,

während Aminosäuren, die in mindestens 3 der 5 Sequenzen übereinstimmen mit hellerem Grau hinterlegt sind.

Kurze Beschreibung der Erfindung

5

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, neuartige Mittel bereitzustellen, mit deren Hilfe Sialinsäure-gesteuerte biologische oder patho-biologische Prozesse beeinflussbar sind.

- 10 Obige Aufgabe konnte überraschenderweise gelöst werden durch Bereitstellung neuartiger Enzyme mit Trans-Sialidase-Aktivität und der kodierenden Sequenzen davon aus *Trypanosoma congolense*.

- 15 Ein erster Gegenstand der Erfindung betrifft Polynukleotide, welche für Proteine mit Trans-Sialidase-Aktivität kodieren und aus *Trypanosoma congolense* isolierbar sind, wobei diese Proteine vorzugsweise den Transfer von Sialinsäure von einem Donor auf ein Akzeptormolekül katalysieren.

- 20 Bevorzugte Polynukleotide umfassen wenigstens eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1 oder 3, oder stellen Fragmente davon dar, welche wenigstens 15 zusammenhängende Nukleotidreste umfassen. Gegenstand der Erfindung sind auch die dazu komplementären Polynukleotide und Fragmente; und die von diesen Polynukleotiden durch Entartung des genetischen Codes abgeleiteten Nukleotidsequenzen.

25

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Oligonukleotide, welche mit einem erfindungsgemäßen Polynukleotid, insbesondere unter stringenten Bedingungen, hybridisieren.

- 30 Gegenstand der Erfindung sind auch Polynukleotide, welche mit einem Oligonukleotid gemäß obiger Definition, insbesondere unter stringenten

Bedingungen, hybridisieren und für ein Genprodukt aus Mikroorganismen der Gattung *Trypanosoma* kodieren.

Gegenstand der Erfindung sind auch Polypeptide, welche von einem Polynukleotid kodiert werden, das eine Nukleinsäuresequenz gemäß obiger Definition umfasst; oder welche eine Aminosäuresequenz aufweisen, die wenigstens 10 zusammenhängende Aminosäuren gemäß SEQ ID NO: 2 oder 4 umfasst; sowie funktionale Äquivalente davon, welche Trans-Sialidase-Aktivität besitzen.

Gegenstand der Erfindung sind insbesondere Trans-Sialidasen oder funktionale Äquivalente davon mit Trans-Sialidase-Aktivität, gekennzeichnet durch eine der folgenden Aminosäureteilsequenzen:

TDTVAKYSTDGGRTWKREVIIPNGR (Pos. 1 bis 25 gemäß SEQ ID NO:2)

FRIPSLVEIDGVLIATFDTRYLRASDSSLI (Pos. 1 bis 30 gemäß SEQ ID NO:4).

Eine bevorzugte Trans-Sialidase 1 (TS1) ist durch wenigstens eines der folgenden Charakteristika gekennzeichnet:

Nukleotidteilsequenz	SEQ ID NO:1
Aminosäureteilsequenz	SEQ ID NO:2
Temperaturoptimum	30-40°C
pH Optimum	pH 6.5-8.5
Isoelektrischer Punkt	pH 4-5
Molekulargewicht nativ	400-600 kDa
Molekulargewicht im reduzierenden SDS- page	90 kDa

Eine weitere bevorzugte Trans-Sialidase 2 (TS2), ist durch wenigstens eines der folgenden Charakteristika gekennzeichnet:

Nukleotidteilsequenz	SEQ ID NO:3
Aminosäureteilsequenz	SEQ ID NO:4
Temperaturoptimum	30-40°C
pH Optimum	pH 6.5-8.5
Isoelektrischer Punkt	pH 5-6
Molekulargewicht nativ	120-180 kDa
Molekulargewicht im reduzierenden SDS- page	90 kDa

Die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Polynukleotide und Polypeptide, insbesondere kodierenden Nukleinsäuresequenzen und Aminosäuresequenzen sind aus dem Organismus *Trypanosoma congolense* ableitbar. Sie sind aber auch unter Anwendung synthetischer, insbesondere chemischer, biochemischer, enzymatischer, gentechnologischer und transgener Methoden zugänglich.

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin funktionale Äquivalente erfindungsgemäßer Trans-Sialidasen.

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Expressionskassetten, umfassend in operativer Verknüpfung mit wenigstens einer regulativen Nukleinsäuresequenz eine Nukleinsäuresequenz gemäß obiger Definition. Weiterhin umfasst die Erfindung auch rekombinante Vektoren, enthaltend wenigstens eine dieser Expressionskassetten.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem prokaryotische oder eukaryotische Wirte, transformiert mit wenigstens einem Vektor gemäß obiger Definition.

Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung einer Expressionskassette, eines Vektors oder eines Wirts gemäß obiger Definition zur rekombinanten Herstellung eines Proteins mit Trans-Sialidase-Aktivität.

- 5 Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur enzymatischen Sialisierung eines Akzeptormoleküls, dadurch gekennzeichnet, dass man das Akzeptormolekül mit einem Sialinsäurereste enthaltenden Donor in Gegenwart einer Trans-Sialidase gemäß obiger Definition inkubiert und den sialylierten Akzeptor isoliert.
- 10 Derartige Verfahren sind durch wenigsten eine weitere der folgenden Eigenschaften charakterisiert:
- a) der Donor ist ausgewählt unter an Oligosaccharide, Polysaccharide, Polysialinsäuren, Glykoproteine und Glykolipide gebundene Sialinsäuren, wie insbesondere Lactoferrine, glykolisierte Molkenproteine und Caseine und Fragmente
- 15 davon;
- b) der Akzeptor ist ausgewählt unter β -Galaktose enthaltenden Polymeren, wie β -Galaktooligosacchariden, Laktitol, Laktobionsäure, Methyl- β -lactosid, Acetyllaktosaminen, Galaktopyranosiden, Trans-Galaktooligosacchariden, Polygalaktose und anderen Glykokonjugaten mit endständig gebundener $\beta(1-3)$ oder
- 20 $\beta(1-4)$ -Galaktose; oder Galaktose.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung einer erfindungsgemäßen Trans-Sialidase, einer dafür kodierenden Nukleinsäuresequenz oder eines erfindungsgemäß hergestellten Sialisierungsprodukts zur Herstellung

25 eines Medikaments, Nahrungsmittels oder Nahrungsergänzungsmittels oder einer Nahrungsmittelzusatzes zur Prävention oder Behandlung Sialinsäure-gesteuerter parasitärer, bakterieller oder viraler Infektionen; zur Behandlung von Tumorerkrankungen; zur Behandlung von Erkrankungen, welche mit einer Entwicklungsstörung des Gewebes assoziiert sind; zur Behandlung von

30 Erkrankungen des Immunsystems; zur Behandlung von Autoimmunreaktionen; zur Behandlung von Erkrankungen mit gestörter Zellkommunikation; und/oder zur Behandlung von Entzündungen.

Insbesondere ist Gegenstand der Erfindung die Verwendung einer erfindungsgemäßen Trans-Sialidase gemäß obiger Definition, zur Entwicklung eines Trypanosomiasis-Impfstoffs oder zur Entwicklung von Enzyminhibitoren zur
5 Behandlung oder Prävention von Trypanosoma-Infektionen.

Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung einer Trans-Sialidase, einer dafür kodierenden Nukleinsäuresequenz oder eines erfindungsgemäß hergestellten sialylierten Produkts zur Herstellung eines Medikaments,
10 Nahrungsergänzungsmittels oder Nahrungsmittels zum Schutz körpereigener Zellen oder Gewebe oder Glykoproteine vor enzymatischer Einwirkung.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die Verwendung einer Trans-Sialidase, einer dafür kodierenden Nukleinsäuresequenz oder eines erfindungsgemäß hergestellten
15 sialylierten Produkts zur Herstellung eines Medikaments, Nahrungsergänzungsmittels oder Nahrungsmittels zu Beeinflussung der Entwicklung und/oder Morphogenese von Körpergeweben.

Weiterhin betrifft die Erfindung Effektoren der Trans-Sialidase-Aktivität einer Trans-Sialidase, ausgewählt unter
20 a) Polypeptid-Liganden, welche mit einer Trans-Sialidase gemäß obiger Definition wechselwirken;
b) niedermolekularen Effektoren, welche die biologische Aktivität einer Trans-Sialidase gemäß obiger Definition modulieren; und
25 c) Antisense-Nukleinsäuresequenzen zu einer Nukleinsäuresequenz gemäß obiger Definition.

Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung eines solchen Effektors zur Herstellung eines Medikaments, Nahrungsergänzungsmittels oder Nahrungsmittels
30 zur Behandlung oder Prävention von mit Trans-Sialidase-Aktivität assoziierten Erkrankungen.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zur Isolierung eines Enzyms mit Trans-Sialidase-Ayktivität, wobei man

a) *Trypanosoma congolense* in einem Medium kultiviert, und

5 b) das gewünschte Produkt aus dem Kulturüberstand durch Ionenaustauschchromatographie mit Hilfe eines Salzgradienten, gegebenenfalls gefolgt von Isoelektrischer Fokussierung, Gelfiltration, Affinitätschromatographie und/oder Proteinfällung, isoliert.

10 Schließlich berifft die Erfindung pharmazeutisches oder gentherapeutisches Mittel, enthaltend in einem pharmazeutisch oder gentherapeutisch verträglichen Träger wenigsten einen Effektor gemäß obiger Definition

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

15

i) Bedeutung der Erfindung

Die Bedeutung der vorliegenden Erfindung ergibt sich aus der mit dieser Erfindung nun möglichen Beeinflussung der Sialinsäure-gesteuerten parasitären, bakteriellen und viralen Infektionsmechanismen, der Beeinflussung der Zellkommunikation und des Immunsystems und der Veränderung der Regulations- und Entwicklungsmechnismen menschlicher und tierischer Gewebe sowie von Tumoren. Dies wird durch die gezielte Übertragung von Sialinsäuren auf biologisch relevante Glykostrukturen (Glykane, Glykanderivate und Glykokonjugate) mittels der hierin beschriebenen Trans-Sialidasen erreicht.

25

Aus der Übertragung der Sialinsäuren auf ausgewählte Trägerstrukturen ergeben sich beispielsweise Produkte zur Veränderung von Entzündungsreaktionen, Veränderung zellulärer Interaktionen im menschlichen und tierischen Körper, Schutz körpereigener Gewebe vor Angriffen des eigenen Immunsystems (Autoimmunreaktionen), „Enttarnung“ von Krebszellen im Körper eines Patienten, damit sie vom körpereigenen Immunsystem wieder bekämpft werden (Krebstherapie

30

und Krebsprävention), Bekämpfung des Eindringens pathogener Bakterien in den menschlichen und tierischen Körper, Prävention und Bekämpfung von viralen Infektionen, Bekämpfung von Infektionen der Magenschleimhaut durch *Helicobacter pylori*, Bekämpfung der durch Bakterien und Viren hervorgerufenen Neugeborenen-Meningitis, Präventive und therapeutische Beeinflussung von Rezeptoren von eukaryontischen und prokaryontischen pathogenen Organismen, Bakterien, Viren und Toxinen zur Vermeidung derer Wirkungsentfaltung im menschlichen und tierischen Körper, Inhibition der Bindung des Cholera-Toxins an menschliche und tierische Schleimhäute des Verdauungstraktes, Entwicklung eines Impfstoffes gegen Trypanosomiasis, Entwicklung von Enzyminhibitoren zur Bekämpfung (Therapie) von *Trypanosoma* Infektionen, Beeinflussung molekularer und zellulärer Erkennungsprozesse im menschlichen und tierischen Körper, Schutz von Glykoproteinen und Zellen vor dem Angriff durch Proteasen und andere Enzyme, unter anderem auch zum Schutz des Abbaus der Moleküle durch Enzyme des menschlichen und tierischen Verdauungstraktes, Beeinflussung der Entwicklung von Körpergeweben und Beeinflussung der Morphogenese von Körpergeweben.

Die erfindungsgemäßen Trans-Sialidasen sind durch folgende DNS- und Aminosäure-Teilsequenzen sowie durch andere DNS-Sequenz-Homologe, z.B. mit einer mehr als 60 prozentigen Übereinstimmung (Identität) zu diesen Teilsequenzen, charakterisiert.

ii) Sequenzangaben zu bevorzugten Trans-Sialidasen

(1) Informationen für die Sequenz des Enzyms TS1:

Merkmale der DNS der Teilsequenz von TS1:

Länge: 1491 Basenpaare

Typ: Nukleinsäure

Strangform: doppelt

Ursprung: *Trypanosoma congolense*

DNS Teilsequenz des Enzyms TS1 (SEQ ID NO: 1):

5'ACCGACACCGTTGCTAAATACAGCACTGACGGTGGGAGAACGTGGAAGAGG
GAGGTTATAATTCCGAATGGTCGTGTGGATGCCCACTACTCCCGCGTCGTTGAT
CCCACTGTTGTTGCGAAGGGTAATAACATTTATGTTCTCGTTGGGCGGTACAAT
5 GTCACGCGGGGCTACTGGCACAATAGGAACAACAAGGCTGGCATAGCCGATTG
GGAGCCCTTCGTGTACAAGGGCACGGTGAACGTGGGCACGAAGGGCAATGCC
ACTGATGTGTCGATCAGCTGGGAGAGGACTGCACTGAAGTCGCTGTACAACTT
CCCGGTTTTCGGGAAGCCCTGGCACGCAGTTCCTTGGAGGGGGCTGGGGGTGGT
GTTGTAACATCCAACGGGACGATTGTGCTGCCAGTGCAGGCAAGGAACAAGGC
10 CAACCGTGTTGTGAGCATGATCCTGTACTCGGCTGACGATGGAAAGTCATGGC
ACTTTGGGAAGGGTGAGGCCGGTGTAGGCACGTCCGAGGCTGCCCTCACTGA
GTGGGACGGCAAGCTGCTGATTAGTGCACGATCCGATGGTGGACAGGGCTAC
CGCATGATATTCGAATCGAGTGACCTTGGTGCGACGTGGAAAGAGATGCTCAA
CAGCATCTCCCGCGTGATTGGCAACTCTCCGGGTGCGAGTGGTCCTGGCAGCT
15 CGAGTGGCTTCATCACGGTGACAGTGGAGGGTGTGCCTGTGATGCTGATTACC
CACCCGAAGAACCTTAAGGGCTCGTATTATCGGGACCGTCTGCAGCTGTGGAT
GACGGACGGCAATCGTATGTGGCATGTCCGGGCAGGTCTCTGAGGGCGACGAT
AACAGCGCTTACAGCTCCCTGCTGTACACTCCGGACGGGGTCCTGTACTGCTT
GCATGAGCAGAACATTGATGAGGTGTACAGCCTCCACCTTGTGCGCCTTGTGG
20 ACGAGCTGAAAAGCATTAAATCAACGGCTCTGGTGTGGAAGGCACAGGACGAG
CTTCTCCTGGGCAACTGCCTCCCGGGCGATAAATACGATCCCGGGTGTGACGG
CATCCCCACCGCTGGGCTTGCCGGGCTGCTGGTAGGACCCCTGACGGAGAAG
ACGTGGCCCGACGCGTATCGGTGCGTGAACGCTGCAACCAGCGGCGCTGTGA
GCACTGCTGAAGGCGTGCGGCTGGACGTGGGTGGCGGTGGCCATGTTGTGTG
25 GCCCGTGAGTGAGCAGGGGCAGGACCAGCGGTATTACTTTACCAACAGCGAGT
TCACGCTCGCCGTCACGGTGCGGTTTGACGAGATGCCACGGGGGGAGCTCCC
GTTGCTGGGGTTTGTGAACCGCAAAGGGAAGGTGAAGAAGATACTGAAGGTGT
CGCTGAGCGGGGTGGAGTGGCTCCTGGCATAACGGGAATGAGTACAACAGCAC
AGCCGCTGAGCCGCTGGACGTGAACGAGAGCCACCAGGTGGTGCTAGCGCTT
30 CACGACGGGATCGTCTCC 3'

Aminosäureteilsequenz des Enzyms TS1 (SEQ ID NO: 2):

TDTVAKYSTDGGRTWKREVIIPNGRVD AHYSRVVDPTVWAKGNNIYVLVGRYNVTR
GYWHNRNNKAGIADWEPFVYKGT VNVGTKGNATDVSISWERTALKSLYNFPVSGS
PGTQFLGGAGGGVWTSNGTIVLPVQARNKANRVVSMILYSADDGKSWHFGKGEA
GVGTSEAALTEWDGKLLISARSDGGQGYRMIFESSDLGATWKEMLNSISRVIGNSP
5 GRS GPGSSSGFITVTVEGVPVMLITHPKNLKGSYYRDLRLQLWMTDGNRMWHVGQ
VSEGDDNSAYSSLLYTPDGVLYCLHEQNIDEVYSLHLVRLVDELKSIKSTALVWKAQ
DELLLGNC L PGDKYDPGCDGIPTAGLAGLLVGPLTEKTWPDAYRCVNAATSGAVST
AEGVRLDVGGGGHVWVPVSEQQDQRY YFTNSEFTLAVTVRFDEMPRGELPLL G
FVNRKGKVKKILKVSLSGVEWLLAYGNEYNSTAAEPLDVNESHQVVLALHDGIVS

10

(2) Informationen für die Sequenz des Enzyms TS2:

Merkmale der DNS der Teilsequenz von TS2: Länge: 831 Basenpaare

15

Typ: Nukleinsäure

Strangform: doppelt

Ursprung: *Trypanosoma congolense*

DNS Teilsequenz des Enzyms TS2 (SEQ ID NO: 3):

20

5' TTCCGAATTCCCTCACTTGTTGAGATAGACGGCGTGCTTATCGCGACATTCGA
TACACGTTATCTTCGCGCTTCCGACAGCAGTCTCATAGACACAGCTATGAAATA
CAGTGCCGATCAGGGGAAGACGTGGAAACTGAAATCATAATAAAAAATGCTAG
ACTAACTGATAACTTTTCCCGCGTCGTTGATCCAACGGTTGTTGTTAAGGGTGA
TAACTTGTTTATTTTGTGTTGGGAGGTACAACACCTCATCTGCCCATGGGTCTG
25 GCAGGAAAACGGTAAAGACTGGGATGTACTGTTGTACAAGGCCAAGGTGAGGA
AGGAATCAGCGGGTGGGGTACCATCAGTGAGCTTTACATGGGACGAACCCCTA
TACCTGAAGCATCTGCTCACCTCTGTCTGGTAAAATAGACGGCAGGTCCCTCATA
CAATACATTGGTGGCGTTGGAAATGGTATTGTAACACCGAAAGGTACTATCGTG
TTTCCAGTTCAGGTTTTAAACACCAACAAATCCGT CATGAACATGCTTCTGTATT
30 CAAGTAACGACGGAAAAACCTGGGAGTTCAGCAAACTTCCACACCCGCGGGGC
ACAACTGAGGCCTCCCTTGTTTGGTGGGATGGACAACTACTTCTCACAAGCAGA
ACAACTCCGGATGTCGGCAGCCGCAAAGTATATTTAACAAGCGACCTCGGAACT

TCATGGAATGAAGCGATCGGAAGTATCTCTCGTGTAATTGGTAACTCGCGGTAC
 CGTAACGATCCTGGGGGGGTCAGGTAGCTCAATTGCCATAACTGTGGAGGGAGT
 ACCGGTGATGCTGATTACCCACCCG3'

5 Aminosäureteilsequenz des Enzyms TS2 (SEQ ID NO: 4):

FRIPSLVEIDGVLIATFDTRYLRASDSSLIDTAMKYSADQGKTWKTEIIKNARLTDNF
 SRVVDPTVVVKGDNLFIIVGRYNTSSAPWWWQENGKDWDVLLYKAKVRKESAGG
 VPSVSFTWDEPLYLKHLTTSVGKIDGRSLIQYIGGVGNGIVTPKGTIVFPVQVLNTNK
 SVMNMLLYSSNDGKTWEFSKTSTPAGTTEASLVWWDGQLLLTSRTTPDVGSRKV
 10 YLTSDLGTSWNEAIGSISRIVIGNSRYRNDPGGSGSSIAITVEGVPVMLITHP

Die Teilsequenzen der Aminosäuren von Enzym TS1 und Enzym TS2 haben eine Übereinstimmung (Identität) von nur ca. 50%. Die Teilsequenzen charakterisieren daher eindeutig zwei verschiedene Stoffe (siehe Bild 1).

15

iii) Beschreibung der Eigenschaften der neu gefundenen Enzyme TS1 und TS2

a) Physikalisch/chemische Eigenschaften der Stoffe

20 Tabelle 1: Basisdaten der beiden Trans-Sialidasen TS1 und TS2

Eigenschaften	TS1	TS2
Temperaturoptimum	30-40°C	30-40°C
pH Optimum	pH 6.5-8.5	pH 6.5-8.5
Isoelektrischer Punkt	pH 4-5	pH 5-6
Molekulargewicht nativ	400-600 kDa	120-180 kDa
Molekulargewicht im reduzierenden SDS- page	90 kDa	90 kDa
Salzeinfluss	1M KCl und NaCl reduziert die Aktivität beider Enzyme um 50%, Entsalzung stellt Enzymaktivität wieder her	
Einfluss von Metallionen	20 mM Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺ : kein Einfluss	
	5 mM Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Fe ²⁺ , Co ²⁺ : wenig Einfluss	

Einfluss von putativen Inhibitoren	10 mM <i>N</i> -(4-Nitrophenyl)oxamsäure: wenig Inhibition 10 mM <i>N</i> -acetyl-2,3-didehydr-2-deoxyneuraminsäure: wenig Inhibition.
------------------------------------	---

b) Biologische Eigenschaften der Stoffe

Die beiden hier beanspruchten Stoffe sind zwei Enzyme, die Sialinsäuren von einem Donormolekül auf ein Akzeptormolekül übertragen.

Als Donoren fungieren bei beiden Enzymen an Glykane, z. B. an Oligosaccharide, Polysaccharide, Polysialinsäuren, Glykoproteine und Glykolipide, gebundene Sialinsäuren. Unter den Glykoproteinen sind insbesondere Lactoferrine (aus Mensch, Kuh, Ziege, Schaf, Pferd, Kamel und anderen Tieren), glykolisierte Molkenproteine (aus Mensch, Kuh, Ziege, Schaf, Pferd, Kamel und anderen Tieren) und Caseine (aus Mensch, Kuh, Ziege, Schaf, Pferd, Kamel und anderen Tieren) sowie andere glykolisierte Proteine humanen, tierischen und pflanzlichen Ursprungs sowie Teilen davon, wie z. B. Teilstücke aus Caseinen (aus Mensch, Kuh, Ziege, Schaf, Pferd, Kamel und anderen Tieren) wie beispielsweise das Glykomakropeptid aus den Caseinen dieser Tiere gute Donoren für Sialinsäuren, die von den Enzymen übertragen werden können. Ganglioside können ebenfalls als Donoren eingesetzt werden.

Beide Trans-Sialidasen haben eine gute Akzeptorspezifität für Galaktooligosaccharide, insbesondere für beta-Galakto-Oligosaccharide, wie z. B. *Vivinal GOS* von der Firma *Borculo Domo Ingredients* (BDI) und *Oligomate 55* von der Firma *Yakult*. Außerdem können Laktitol, Laktobionsäure, Methyl- β -lactosid, Acetyllaktosamine, Galaktopyranoside, Trans-Galaktooligosaccharide, Polygalaktosen und andere Glykokonjugate mit endständig gebundener β (1-3) oder β (1-4)-Galaktose als Akzeptoren fungieren. Eine Methylierung des Galaktoserestes führt zu einer Verminderung der Akzeptorfunktion. Die Methylierung eines Glukoserestes (z. B. bei der Laktose) hat einen geringen Einfluss auf die

Akzeptorfunktion. Das Monosaccharid Galaktose dient ebenfalls als Akzeptor, wenn auch mit geringerer Spezifität.

Das Enzym TS1 zeigt eine etwa doppelt so effiziente Übertragung der Sialinsäuren auf die entsprechenden Akzeptoren wie das Enzym TS2. Die Substrate können frei, d.h. löslich, oder auch Zellmembran-gebunden sein.

Die Übertragung von alpha-2,3-gebundenen endständigen Sialinsäuren auf beta-1,4-gebundene endständige Galaktosereste ist auch von den Trans-Sialidasen von *Trypanosoma cruzi* (Schenkman *et al.*, 1991; Vandekerckhove *et al.*, 1992; Scudder *et al.*, 1993) und *Trypanosoma brucei* (Engstler *et al.*, 1992, 1993, 1995) bekannt. Aufgrund unterschiedlicher DNS- und Aminosäuresequenzen unterscheiden sich TS1 und TS2 jedoch von den bereits bekannten Enzymen. TS1 und TS2 sind damit eindeutig als neue Stoffe (Trans-Sialidasen) charakterisiert. Zur weiteren Abgrenzung siehe den nächsten Absatz.

iv) Abgrenzung der Erfindung zu anderen Trans-Sialidasen, Sialidasen und Sialyltransferasen

Das erste Mal beschrieben wurde ein Enzym „Trans-Sialidase“ in der amerikanischen Trypanosomenart *Trypanosoma cruzi* (Schenkman *et al.*, 1991). Wenig später konnte das Enzym ebenfalls in den afrikanischen Arten *Trypanosoma brucei gambiense*, *Trypanosoma brucei rhodesiense* und *Trypanosoma brucei brucei* nachgewiesen werden (Engstler *et al.*, 1993, Pontes de Carvalho *et al.*, 1993, Engstler *et al.*, 1995). Weiterhin wurde Trans-Sialidase in *Endotrypanum* Arten (Parasiten, die das Faultier befallen) (Medina-Acosta *et al.*, 1994), in *Corynebacterium diphtheriae* (Mattos-Guaraldi *et al.*, 1998) und im menschlichen Plasma (Tertov *et al.* 2001) detektiert. Bereits lange vor den Nachweis der Trans-Sialidasen waren die sogenannten Sialidasen bekannt. Dies sind Glykohydrolasen, die Sialinsäuren von einem Donormolekül ausschließlich auf Wasser übertragen, die Sialinsäuren also von Oligosacchariden und Glykokonjugaten abhydrolysieren.

Weiterhin können bestimmte Enzyme mit Cytidin-Monophosphat (CMP)-aktivierte Sialinsäuren auf andere Zuckerreste, meist Galaktose und N-Acetylgalaktosamin, übertragen. Diese Enzyme nennt man Sialyltransferasen (siehe Bild 2).

5 Die hier beanspruchten Trans-Sialidasen übertragen Sialinsäuren nicht ausschließlich von einem Donormolekül auf Wasser, wie dies die reinen Sialidasen tun. Fehlt jedoch ein geeigneter Akzeptor, hydrolysieren die hier beanspruchten Trans-Sialidasen die Sialinsäuren ebenso wie die einfachen Sialidasen. Die hier beanspruchten Trans-Sialidasen benötigen auch keine aktivierten Sialinsäuren für
10 ihre Übertragungsreaktion wie die zuvor erwähnten Sialyltransferasen. Die Trans-Sialidasen haben auch eine breitere Donor- und Akzeptorspezifität als die Sialyltransferasen und sind deshalb besonders vielseitig einsetzbar. Die hier beanspruchten Trans-Sialidasen sind damit für die industrielle Verwertung vorteilhafter als die reinen Sialidasen und Sialyltransferasen.

15

Bisher sind nur die DNS- und Aminosäuresequenzen der Trans-Sialidasen von *Trypanosoma cruzi* und *Trypanosoma brucei brucei* bekannt, sowie die DNS- und Aminosäuresequenz einer reinen Sialidase aus *Trypanosoma rangeli*. Das hier beanspruchte Enzym TS1 hat zu der entsprechenden Aminosäureteilsequenz der
20 Trans-Sialidase aus *Trypanosoma brucei brucei* eine Übereinstimmung (Identität) von unter 60% und zu der entsprechenden Teilsequenz von *Trypanosoma cruzi* eine Übereinstimmung von unter 50%. Das hier beanspruchte Enzym TS2 hat zu der entsprechenden Aminosäureteilsequenz der Trans-Sialidase aus *Trypanosoma brucei brucei* eine Übereinstimmung (Identität) von unter 50% und zu der
25 entsprechenden Teilsequenz von *Trypanosoma cruzi* eine Übereinstimmung von ebenfalls unter 50% (siehe Bild 3). Des Weiteren ist bekannt, dass die Übereinstimmung der Aminosäuren zwischen den Trans-Sialidasen von Trypanosomen und den bekannten Sialidasen und Trans-Sialidasen von Bakterien und Viren nur 20% bis 30% beträgt (Chuenkova et al., 1999, Montagna et al., 2002).

30

Bei den hier beschriebenen Enzymen handelt es sich somit um neu charakterisierte Stoffe (Enzyme), deren Übereinstimmung (Identität) zu den entsprechenden DNS-

und Aminosäuresequenzen anderer bekannter Enzyme ähnlicher Funktion unter 60% beträgt.

v) Weitere Erläuterungen zur vorliegenden Erfindung

5

a) Polypeptide und funktionale Äquivalente

„Polypeptide“ im Sinne der Erfindung umfassen charakteristische Teilfragmente der erfindungsgemäßen Aminosäuresequenzen, ebenso wie Aminosäuresequenzen der
10 erfindungsgemäßen Enzyme und der funktionalen Äquivalente davon.

Erfindungsgemäß mit umfasst sind somit ebenfalls „funktionale Äquivalente“ oder „Homologe“ der konkret offenbarten neuen Polypeptide bzw. Enzyme.

15 „Funktionale Äquivalente“ oder Analoga der konkret offenbarten Polypeptide sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung davon verschiedene Polypeptide, welche weiterhin die gewünschte biologische Aktivität gemäß obiger Definition (wie z.B. Substratspezifität) besitzen.

20 Unter „funktionalen Äquivalenten“ versteht man erfindungsgemäß insbesondere Mutanten, welche in wenigstens einer der oben genannten Sequenzpositionen eine andere als die konkret genannte Aminosäure aufweisen aber trotzdem eine der hierin genannten biologische Aktivität besitzen. „Funktionale Äquivalente“ umfassen somit die durch eine oder mehrere Aminosäure-Additionen, -Substituenten, -
25 Deletionen und/oder -Inversionen erhältlichen Mutanten, wobei die genannten Veränderungen in jeglicher Sequenzposition auftreten können, solange sie zu einer Mutante mit dem erfindungsgemäßen Eigenschaftsprofil führen. Funktionale Äquivalenz ist insbesondere auch dann gegeben, wenn die Reaktivitätsmuster zwischen Mutante und unverändertem Polypeptid qualitativ übereinstimmen, d.h.
30 beispielsweise gleiche Substrate mit unterschiedlicher Geschwindigkeit umgesetzt werden.

„Funktionale Äquivalente“ im obigen Sinne sind auch Präkursoren der beschriebenen Polypeptide sowie funktionale Derivate und Salze der Polypeptide. Unter dem Ausdruck „Salze“ versteht man sowohl Salze von Carboxylgruppen als auch Säureadditionssalze von Aminogruppen der erfindungsgemäßen Proteinmoleküle. Salze von Carboxylgruppen können in an sich bekannter Weise
5 hergestellt werden und umfassen anorganische Salze, wie zum Beispiel Natrium-, Calcium-, Ammonium-, Eisen- und Zinksalze, sowie Salze mit organischen Basen, wie zum Beispiel Aminen, wie Triethanolamin, Arginin, Lysin, Piperidin und dergleichen. Säureadditionssalze, wie zum Beispiel Salze mit Mineralsäuren, wie
10 Salzsäure oder Schwefelsäure und Salze mit organischen Säuren, wie Essigsäure und Oxalsäure sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

„Funktionale Derivate“ erfindungsgemäßer Polypeptide können an funktionellen Aminosäure-Seitengruppen oder an deren N- oder C-terminalen Ende mit Hilfe
15 bekannter Techniken ebenfalls hergestellt werden. Derartige Derivate umfassen beispielsweise aliphatische Ester von Carbonsäuregruppen, Amide von Carbonsäuregruppen, erhältlich durch Umsetzung mit Ammoniak oder mit einem primären oder sekundären Amin; N-Acylderivate freier Aminogruppen, hergestellt durch Umsetzung mit Acylgruppen; oder O-Acylderivate freier Hydroxygruppen,
20 hergestellt durch Umsetzung mit Acylgruppen.

„Funktionale Äquivalente“ umfassen natürlich auch Polypeptide welche aus anderen Organismen zugänglich sind sowie natürlich vorkommende Varianten. Beispielsweise lassen sich durch Sequenzvergleich Bereiche homologer
25 Sequenzregionen festlegen und in Anlehnung an die konkreten Vorgaben der Erfindung äquivalente Enzyme ermitteln.

„Funktionale Äquivalente“ umfassen ebenfalls Fragmente, vorzugsweise einzelne Domänen oder Sequenzmotive, der erfindungsgemäßen Polypeptide, welche z.B.
30 die gewünschte biologische Funktion aufweisen.

„Funktionale Äquivalente“ sind außerdem Fusionsproteine, welche ein der oben genannten Polypeptidsequenzen oder davon abgeleitete funktionale Äquivalente und wenigstens eine weitere, davon funktionell verschiedene, heterologe Sequenz in funktioneller N- oder C-terminaler Verknüpfung (d.h. ohne gegenseitigen wesentliche funktionelle Beeinträchtigung der Fusionsproteinteile) aufweisen. Nichtlimitierende Beispiele für derartige heterologe Sequenzen sind z.B. Signalpeptide, Enzyme, Immunoglobuline, Oberflächenantigene, Rezeptoren oder Rezeptorliganden.

„Funktionale Äquivalente“ erfindungsgemäßer Trans-Sialidasen sind insbesondere Enzyme, deren Aminosäuresequenzen oder -teilsequenzen zur korrespondierenden Aminosäuresequenz oder -teilsequenz gemäß SEQ ID NO: 2 oder 4 eine Sequenzidentität (Sequenzhomologie) von wenigsten 60 % insbesondere wenigstens 65 % oder wenigstens 70 %, wie z.B. 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% oder 99%, berechnet nach dem Algorithmus von Pearson und Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85(8), 1988, 2444-2448, aufweisen.

Im Falle einer möglichen Proteinglykosylierung umfassen erfindungsgemäße Äquivalente Proteine des oben bezeichneten Typs in deglykosylierter bzw. glykosylierter Form sowie durch Veränderung des Glykosylierungsmusters erhältliche abgewandelte Formen.

Homologe der erfindungsgemäßen Proteine oder Polypeptide können durch Mutagenese erzeugt werden, z.B. durch Punktmutation, Verlängerung oder Verkürzung des Proteins. Der Begriff "Homolog", wie er hier verwendet wird, betrifft auch eine variante Form des Proteins, die als Agonist oder Antagonist der Protein-Aktivität wirkt.

Homologe der erfindungsgemäßen Proteine können durch Screening kombinatorischer Banken von Mutanten, wie z.B. Verkürzungsmutanten, identifiziert werden. Beispielsweise kann eine variierte Bank von Protein-Varianten durch kombinatorische Mutagenese auf Nukleinsäureebene erzeugt werden, wie z.B. durch enzymatisches Ligieren eines Gemisches synthetischer Oligonukleotide. Es

gibt eine Vielzahl von Verfahren, die zur Herstellung von Banken potentieller Homologer aus einer degenerierten Oligonukleotidsequenz verwendet werden können. Die chemische Synthese einer degenerierten Gensequenz kann in einem DNA-Syntheseautomaten durchgeführt werden, und das synthetische Gen kann
5 dann in einen geeigneten Expressionsvektor ligiert werden. Die Verwendung eines degenerierten Gensatzes ermöglicht die Bereitstellung sämtlicher Sequenzen in einem Gemisch, die den gewünschten Satz an potentiellen Proteinsequenzen codieren. Verfahren zur Synthese degenerierter Oligonukleotide sind dem Fachmann bekannt (Z.B. Narang, S.A. (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al. (1984)
10 Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al., (1984) Science 198:1056; Ike et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11:477).

b) Polynukleotide

15 „Polynukleotide“ im Sinne der vorliegenden Erfindung umfassen charakteristische Teilfragmente der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen die für Aminosäureteilsequenzen erfindungsgemäßer Enzyme kodieren, ebenso wie Nukleinsäuresequenzen die für Enzyme und deren funktionale Äquivalente kodieren. Polynukleotide umfassen vorzugsweise mehr als etwa 20 insbesondere mehr als
20 etwa 30, wie z.B. mehr als etwa 45 oder mehr als etwa 60 Nukleinsäurereste.

„Oligonukleotide“ umfassen insbesondere eine Sequenz von weniger als etwa 60, vorzugsweise weniger als etwa 45, insbesondere weniger als etwa 30 oder weniger als etwa 20 Nukleinsäureresten.

25

Alle hierin erwähnten „Nukleinsäuresequenzen“ sind in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen, wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von
30 Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seiten 896–897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von

Lücken mit Hilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

5

Gegenstand der Erfindung sind auch Nukleinsäuresequenzen (einzel- und doppelsträngige DNA- und RNA-Sequenzen, wie z.B. cDNA und mRNA), kodierend für eines der obigen Polypeptide und deren funktionalen Äquivalenten, welche z.B. auch unter Verwendung künstlicher Nukleotidanaloga zugänglich sind.

10

Die Erfindung betrifft sowohl isolierte Nukleinsäuremoleküle, welche für erfindungsgemäße Polypeptide bzw. Proteine oder biologisch aktive Abschnitte davon kodieren, sowie Nukleinsäurefragmente, die z.B. zur Verwendung als Hybridisierungs sonden oder Primer zur Identifizierung oder Amplifizierung von

15

erfindungsgemäßer kodierenden Nukleinsäuren verwendet werden können.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle können zudem untranslatierte Sequenzen vom 3'- und/oder 5'-Ende des kodierenden Genbereichs enthalten

20

Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül wird von anderen Nukleinsäuremolekülen abgetrennt, die in der natürlichen Quelle der Nukleinsäure zugegen sind und kann überdies im wesentlichen frei von anderem zellulären Material oder Kulturmedium sein, wenn es durch rekombinante Techniken hergestellt wird, oder frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien sein, wenn es chemisch

25

synthetisiert wird.

30

Ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül kann mittels molekularbiologischer Standardtechniken und der erfindungsgemäß bereitgestellten Sequenzinformation isoliert werden. Beispielsweise kann cDNA aus einer geeigneten cDNA-Bank isoliert werden, indem eine der konkret offenbarten vollständigen Sequenzen oder ein Abschnitt davon als Hybridisierungs sonde und Standard-Hybridisierungstechniken (wie z.B. beschrieben in Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. Molecular

Cloning: A Laboratory Manual. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) verwendet werden. Überdies läßt sich ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine der offenbarten Sequenzen oder ein Abschnitt davon, durch Polymerasekettenreaktion isolieren, wobei die Oligonukleotidprimer, die auf der Basis dieser Sequenz erstellt wurden, verwendet werden. Die so amplifizierte Nukleinsäure kann in einen geeigneten Vektor kloniert werden und durch DNA-Sequenzanalyse charakterisiert werden. Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide, können ferner durch Standard-Syntheseverfahren, z.B. mit einem automatischen DNA-Synthesegerät, hergestellt werden.

Die Erfindung umfasst weiterhin die zu den konkret beschriebenen Nukleotidsequenzen „komplementären“ Nukleinsäuremoleküle oder einen Abschnitt davon.

Die erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen ermöglichen die Erzeugung von Sonden und Primern, die zur Identifizierung und/oder Klonierung von homologen Sequenzen in anderen Zelltypen und Organismen verwendbar sind. Solche Sonden bzw. Primer umfassen gewöhnlich einen Nukleotidsequenzbereich, der unter stringenten Bedingungen an mindestens etwa 12, vorzugsweise mindestens etwa 25, wie z.B. etwa 40, 50 oder 75 aufeinanderfolgende Nukleotide eines Sense-Stranges einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz oder eines entsprechenden Antisense-Stranges hybridisiert.

Weitere erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenzen sind abgeleitet von SEQ ID NO: 1 und 3 und unterscheiden sich davon durch Addition, Substitution, Insertion oder Deletion einzelner oder mehrerer Nukleotide, kodieren aber weiterhin für Polypeptide mit dem gewünschten Eigenschaftsprofil.

Erfindungsgemäß umfasst sind auch solche Nukleinsäuresequenzen, die sogenannte stumme Mutationen umfassen oder entsprechend der Codon-Nutzung eines speziellen Ursprungs- oder Wirtsorganismus, im Vergleich zu einer konkret

genannten Sequenz verändert sind, ebenso wie natürlich vorkommende Varianten, wie z.B. Spleißvarianten oder Allelvarianten, davon. Gegenstand sind ebenso durch konservative Nukleotidsubstitutionen (d.h. die betreffende Aminosäure wird durch eine Aminosäure gleicher Ladung, Größe, Polarität und/oder Löslichkeit ersetzt) erhältliche Sequenzen.

Gegenstand der Erfindung sind auch die durch Sequenzpolymorphismen von den konkret offenbarten Nukleinsäuren abgeleiteten Moleküle. Diese genetischen Polymorphismen können zwischen Individuen innerhalb einer Population aufgrund der natürlichen Variation existieren. Diese natürlichen Variationen bewirken üblicherweise eine Varianz von 1 bis 5 % in der Nukleotidsequenz eines Gens.

Weiterhin umfasst die Erfindung auch Nukleinsäuresequenzen, welchen mit oben genannten kodierenden Sequenzen hybridisieren oder dazu komplementär sind. Diese Polynukleotide lassen sich bei Durchmusterung von genomischen oder cDNA-Banken auffinden und gegebenenfalls daraus mit geeigneten Primern mittels PCR vermehren und anschließend beispielsweise mit geeigneten Sonden isolieren. Eine weitere Möglichkeit bietet die Transformation geeigneter Mikroorganismen mit erfindungsgemäßen Polynukleotiden oder Vektoren, die Vermehrung der Mikroorganismen und damit der Polynukleotide und deren anschließende Isolierung. Darüber hinaus können erfindungsgemäße Polynukleotide auch auf chemischem Wege synthetisiert werden.

Unter der Eigenschaft, an Polynukleotide „hybridisieren“ zu können, versteht man die Fähigkeit eines Poly- oder Oligonukleotids unter stringenten Bedingungen an eine nahezu komplementäre Sequenz zu binden, während unter diesen Bedingungen unspezifische Bindungen zwischen nicht-komplementären Partnern unterbleiben. Dazu sollten die Sequenzen zu 70-100%, vorzugsweise zu 90-100%, komplementär sein. Die Eigenschaft komplementärer Sequenzen, spezifisch aneinander binden zu können, macht man sich beispielsweise in der Northern- oder Southern-Blot-Technik oder bei der Primerbindung in PCR oder RT-PCR zunutze. Üblicherweise werden dazu Oligonukleotide ab einer Länge von 30 Basenpaaren eingesetzt.

Unter "stringenten" Bedingungen versteht man, wenn beispielsweise nach dem Southern bzw. Northern Blot die DNA bzw. RNA Fragmente auf den Membranen mit einer Sonde unter spezifischen Bedingungen, das heißt, bei einer Temperatur von
5 60 - 70 °C, (38-42°C bei 50 % Hybridisierungslösungen die 50 % Formamid enthalten) hybridisiert. Weiterhin sind die Bedingungen dann spezifisch bzw. stringent, wenn die im Anschluss an die Hybridisierung durchgeführten Waschschriffe zur Elution unspezifisch hybridisierter DNA bzw. RNA-Sonden ebenfalls spezifisch durchgeführt werden. Bei spezifischen Waschschriffen handelt
10 es sich üblicherweise um das zweimalige Waschen bei 20-25 °C für 5-10min. mit 2 x SSC-Puffer, der 0,1% SDS (Natriumdodecylsulfat) enthält und anschließendem zweimaligen Waschen mit Puffer niedrigerer Ionenstärke (z.B. 0,1 x SSC mit 0,1% SDS) bei höherer Temperatur (z.B. 64 °C). [20x SSC: 3M NaCl, 0,3M Na-Citrat, pH 7,0]. Dabei bleiben nur in hohem Maße komplementäre Nukleinsäuren aneinander
15 gebunden. Die Einstellung stringenter Bedingungen ist dem Fachmann bekannt und ist z.B. in Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. beschrieben.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft "Antisense"-Nukleinsäuren. Diese
20 umfassen eine Nukleotidsequenz, die zu einer kodierenden "Sense"-Nukleinsäure, komplementär ist. Die Antisense-Nukleinsäure kann zum gesamten kodierenden Strang oder nur zu einem Abschnitt davon komplementär sein. Bei einer weiteren Ausführungsform ist das Antisense-Nukleinsäuremolekül antisense zu einem nicht-kodierenden Bereich des kodierenden Stranges einer Nukleotidsequenz. Der Begriff
25 "nicht-kodierender Bereich" betrifft die als 5'- und 3'-untranslatierte Bereiche bezeichneten Sequenzabschnitte.

Ein Antisense-Oligonukleotid kann z.B. etwa 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 Nukleotide lang sein. Eine erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäure kann durch
30 chemische Synthese und enzymatische Ligationsreaktionen mittels im Fachgebiet bekannter Verfahren konstruiert werden. Eine Antisense-Nukleinsäure kann chemisch synthetisiert werden, wobei natürlich vorkommende Nukleotide oder

verschieden modifizierte Nukleotide verwendet werden, die so gestaltet sind, daß sie die biologische Stabilität der Moleküle erhöhen, oder die physikalische Stabilität des Duplexes erhöhen, der zwischen der Antisense- und Sense-Nukleinsäure entstanden ist. Beispielsweise können Phosphorthioat-Derivate und acridinsubstituierte Nukleotide verwendet werden. Beispiele modifizierter Nukleotide, die zur Erzeugung der Antisense-Nukleinsäure verwendet werden können, sind z.B. 5-Fluoruracil, 5-Bromuracil, 5-Chloruracil, 5-Ioduracil, Hypoxanthin, Xanthin, 4-Acetylcytosin, und dergleichen.

10 Die erfindungsgemäßen Antisense-Nukleinsäuremoleküle werden üblicherweise an eine Zelle verabreicht oder in situ erzeugt, so daß sie mit der zellulären mRNA und/oder einer kodierenden DNA hybridisieren oder daran binden, so daß die Expression des Proteins, z.B. durch Hemmung der Transkription und/oder Translation, gehemmt wird.

15

Die Begriffe "exprimieren" bzw. "Verstärkung" oder „Überexpression“ beschreiben im Kontext der Erfindung die Produktion bzw. Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden. Dazu kann man beispielsweise ein Gen in einen Organismus einbringen, ein vorhandenes Gen durch ein anderes Gen ersetzen, die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöhen, einen starken Promotor verwenden oder ein Gen verwenden, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und man kann gegebenenfalls diese Maßnahmen kombinieren.

25

Die Begriffe „abschwächen“ und „verringern“ beschreiben im Kontext der Erfindung die Abschwächung oder Verringerung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden. Dazu kann man beispielsweise ein Gen in einem Organismus deletieren, ein vorhandenes Gen durch ein anderes Gen ersetzen, die Kopienzahl eines Transkriptes des Gens bzw. der Gene erniedrigen, einen schwachen Promotor verwenden oder ein Gen verwenden, das für ein entsprechendes Enzym mit einer

30

niedrigeren Aktivität kodiert und man kann gegebenenfalls diese Maßnahmen kombinieren.

c) Expressionskonstrukte und Vektoren:

5

Gegenstand der Erfindung sind außerdem Expressionskonstrukte, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen eine für ein erfindungsgemäßes Polypeptid kodierende Nukleinsäuresequenz; sowie Vektoren, umfassend wenigstens eines dieser Expressionskonstrukte. Vorzugsweise umfassen
10 solche erfindungsgemäßen Konstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen kodierenden Sequenz einen Promotor und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils operativ verknüpft mit der kodierenden Sequenz.

15 Unter einer „operativen Verknüpfung“ versteht man die sequentielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und gegebenenfalls weiterer regulativer Elemente derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Beispiele für operativ verknüpfbare Sequenzen sind Targeting-Sequenzen sowie Enhancer,
20 Polyadenylierungssignale und dergleichen. Weitere regulative Elemente umfassen selektierbare Marker, Amplifikationssignale, Replikationsursprünge und dergleichen. Geeignete regulatorische Sequenzen sind z.B. beschrieben in Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).

25

Zusätzlich zu den artifiziellen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulationssequenz vor dem eigentlichen Strukturgen noch vorhanden sein. Durch genetische Veränderung kann diese natürliche Regulation gegebenenfalls ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht oder erniedrigt werden. Das
30 Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es werden keine zusätzlichen Regulationssignale vor das Strukturgen insertiert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wird nicht entfernt. Statt dessen wird die natürliche

Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert oder verringert wird. Die Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

5 Beispiele für brauchbare Promotoren sind: cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, lambda-PR- oder im lambda-PL-Promotor, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden; sowie die gram-positiven Promotoren amy und SPO2, die Hefepromotoren ADC1, MFalpha, AC, P-60, CYC1, GAPDH oder die Pflanzenpromotoren CaMV/35S, SSU,
10 OCS, lib4, usp, STLS1, B33, not oder der Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor. Besonders bevorzugt ist die Verwendung induzierbarer Promotoren, wie z.B. licht- und insbesondere temperaturinduzierbarer Promotoren, wie der P_rP_i-Promotor. Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen verwendet werden. Darüber hinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft
15 verwendet werden.

Die genannten regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Nukleinsäuresequenzen und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion
20 exprimiert oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Expression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen oder erniedrigen. So kann
25 eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

30

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten kodierenden Nukleotidsequenz sowie einem

Terminator- oder Polyadenylierungssignal. Dazu verwendet man gängige Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.

- 10 Das rekombinante Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt wird zur Expression in einem geeigneten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen wirtsspezifischen Vektor insertiert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht.

- 15 "Vektoren" sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus und Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können
20 autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden.

Als Beispiele für geeignete Expressionsvektoren können genannt werden:

- 25 Übliche Fusionsexpressionsvektoren, wie pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. und Johnson, K.S. (1988) *Gene* 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) und pRIT 5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), bei denen Glutathion-S-Transferase (GST), Maltose E-bindendes Protein bzw. Protein A an das rekombinante Zielprotein fusioniert wird.

- 30 Nicht-Fusionsprotein-Expressionsvektoren wie pTrc (Amann et al., (1988) *Gene* 69:301-315) und pET 11d (Studier et al. *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 60-89).

Hefe-Expressionsvektor zur Expression in der Hefe *S. cerevisiae*, wie pYepSec1 (Baldari et al., (1987) Embo J. 6:229-234), pMFa (Kurjan und Herskowitz (1982) Cell 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) Gene 54:113-123) sowie pYES2
5 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektoren und Verfahren zur Konstruktion von Vektoren, die sich zur Verwendung in anderen Pilzen, wie filamentösen Pilzen, eignen, umfassen diejenigen, die eingehend beschrieben sind in: van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: Applied Molecular Genetics of Fungi, J.F. Peberdy et al., Hrsg.,
10 S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge.

Baculovirus-Vektoren, die zur Expression von Proteinen in gezüchteten Insektenzellen (bspw. Sf9-Zellen) verfügbar sind, umfassen die pAc-Reihe (Smith et al., (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) und die pVL-Reihe (Lucklow und Summers
15 (1989) Virology 170:31-39).

Pflanzen-Expressionsvektoren, wie solche, die eingehend beschrieben sind in: Becker, D., Kemper, E., Schell, J. und Masterson, R. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", Plant Mol. Biol.
20 20:1195-1197; und Bevan, M.W. (1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", Nucl. Acids Res. 12:8711-8721.

Säugetier-Expressionsvektoren, wie pCDM8 (Seed, B. (1987) Nature 329:840) und pMT2PC (Kaufman et al. (1987) EMBO J. 6:187-195).

25 Weitere geeignete Expressionssysteme für prokaryontische und eukaryotische Zellen sind in Kapitel 16 und 17 von Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T., Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 beschrieben.

30 d) Rekombinante Mikroorganismen:

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vektoren sind rekombinante Mikroorganismen herstellbar, welche beispielsweise mit wenigstens einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert sind und zur Produktion der erfindungsgemäßen Polypeptide eingesetzt werden können. Vorteilhafterweise werden die oben beschriebenen
5 erfindungsgemäßen rekombinanten Konstrukte in ein geeignetes Wirtssystem eingebracht und exprimiert. Dabei werden vorzugsweise dem Fachmann bekannte geläufige Klonierungs- und Transfektionsmethoden, wie beispielsweise Co-Präzipitation, Protoplastenfusion, Elektroporation, retrovirale Transfektion und dergleichen, verwendet, um die genannten Nukleinsäuren im jeweiligen
10 Expressionssystem zur Expression zu bringen. Geeignete Systeme werden beispielsweise in Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997, oder Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 beschrieben.

15 Erfindungsgemäß sind auch homolog rekombinierte Mikroorganismen herstellbar. Dazu wird ein Vektor hergestellt, der zumindest einen Abschnitt eines erfindungsgemäßen Gens oder einer kodierenden Sequenz enthält, worin gegebenenfalls wenigstens eine Aminosäure-Deletion, -Addition oder -Substitution
20 eingebracht worden ist, um die erfindungsgemäße Sequenz zu verändern, z.B. funktionell zu disruptieren ("Knockout"-Vektor). Die eingebrachte Sequenz kann z.B. auch ein Homologes aus einem verwandten Mikroorganismus sein oder aus einer Säugetier-, Hefe- oder Insektenquelle abgeleitet sein. Der zur homologen Rekombination verwendete Vektor kann alternativ derart ausgestaltet sein, daß das
25 endogene Gen bei homologer Rekombination mutiert oder anderweitig verändert ist, jedoch noch das funktionelle Protein codiert (z.B. kann der stromaufwärts gelegene regulatorische Bereich derart verändert sein, daß dadurch die Expression des endogenen Proteins verändert wird). Der veränderte Abschnitt des erfindungsgemäßen Gens ist im homologen Rekombinationsvektor. Die Konstruktion
30 geeigneter Vektoren zur homologen Rekombination ist z.B. beschrieben in Thomas, K.R. und Capecchi, M.R. (1987) Cell 51:503.

Als Wirtsorganismen sind prinzipiell alle Organismen geeignet, die eine Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, ihrer Allelvarianten, ihrer funktionellen Äquivalente oder Derivate ermöglichen. Unter Wirtsorganismen sind beispielsweise Bakterien, Pilze, Hefen, pflanzliche oder tierische Zellen zu verstehen. Bevorzugte
5 Organismen sind Bakterien, wie solche der Gattungen *Escherichia*, wie z. B. *Escherichia coli*, *Streptomyces*, *Bacillus* oder *Pseudomonas*, eukaryotische Mikroorganismen, wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus*, höhere eukaryotische Zellen aus Tieren oder Pflanzen, beispielsweise Sf9 oder CHO-Zellen.

10 Die Selektion erfolgreich transformierter Organismen kann durch Markergene erfolgen, die ebenfalls im Vektor oder in der Expressionskassette enthalten sind. Beispiele für solche Markergene sind Gene für Antibiotikaresistenz und für Enzyme, die eine farbgebende Reaktion katalysieren, die ein Anfärben der transformierten Zelle bewirkt. Diese können dann mittels automatischer Zellsortierung selektiert
15 werden. Erfolgreich mit einem Vektor transformierte Mikroorganismen, die ein entsprechendes Antibiotikaresistenzgen (z.B. G418 oder Hygromycin) tragen, lassen sich durch entsprechende Antibiotika-enthaltende Medien oder Nährböden selektieren. Markerproteine, die an der Zelloberfläche präsentiert werden, können zur Selektion mittels Affinitätschromatographie genutzt werden.

20

Die Kombination aus den Wirtsorganismen und den zu den Organismen passenden Vektoren, wie Plasmide, Viren oder Phagen, wie beispielsweise Plasmide mit dem RNA-Polymerase/Promoter-System, die Phagen 8 oder 7 oder andere temperente Phagen oder Transposons und/oder weiteren vorteilhaften regulatorischen
25 Sequenzen bildet ein Expressionssystem. Beispielsweise ist unter dem Begriff "Expressionssystem" die Kombination aus Säugetierzellen, wie CHO-Zellen, und Vektoren, wie pcDNA3neo-Vektor, die für Säugetierzellen geeignet sind, zu verstehen.

30 Gewünschtenfalls kann das Genprodukt auch in transgenen Organismen, wie transgenen Tieren, insbesondere Mäusen, Schafen oder transgenen Pflanzen zur Expression, gebracht werden.

e) Rekombinante Herstellung der Polypeptide:

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Verfahren zur rekombinanten Herstellung einer erfindungsgemäßen Polypeptide oder funktioneller, biologisch aktiver Fragmente davon, wobei man einen Polypeptide-produzierenden Mikroorganismus kultiviert, gegebenenfalls die Expression der Polypeptide induziert und diese aus der Kultur isoliert. Die Polypeptide können so auch in großtechnischem Maßstab produziert werden, falls dies erwünscht ist.

Der rekombinante Mikroorganismus kann nach bekannten Verfahren kultiviert und fermentiert werden. Bakterien können beispielsweise in TB- oder LB-Medium und bei einer Temperatur von 20 bis 40°C und einem pH-Wert von 6 bis 9 vermehrt werden. Im Einzelnen werden geeignete Kultivierungsbedingungen beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) beschrieben.

Die Zellen werden dann, falls die Polypeptide nicht in das Kulturmedium sezerniert werden, aufgeschlossen und das Produkt nach bekannten Proteinisolierungsverfahren aus dem Lysat gewonnen. Die Zellen können wahlweise durch hochfrequenten Ultraschall, durch hohen Druck, wie z.B. in einer French-Druckzelle, durch Osmolyse, durch Einwirkung von Detergenzien, lytischen Enzymen oder organischen Lösungsmitteln, durch Homogenisatoren oder durch Kombination mehrerer der aufgeführten Verfahren aufgeschlossen werden.

Eine Aufreinigung der Polypeptide kann mit bekannten, chromatographischen Verfahren erzielt werden, wie Molekularsieb-Chromatographie (Gelfiltration), wie Q-Sepharose-Chromatographie, Ionenaustausch-Chromatographie und hydrophobe Chromatographie, sowie mit anderen üblichen Verfahren wie Ultrafiltration, Kristallisation, Aussalzen, Dialyse und nativer Gelelektrophorese. Geeignete Verfahren werden beispielsweise in Cooper, F. G., Biochemische Arbeitsmethoden, Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York oder in Scopes, R., Protein Purification,

Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin beschrieben. Analoges gilt für nicht-rekombinant hergestellte Polypeptide.

Besonders vorteilhaft ist es, zur Isolierung des rekombinanten Proteins Vektorsysteme oder Oligonukleotide zu verwenden, die die cDNA um bestimmte Nukleotidsequenzen verlängern und damit für veränderte Polypeptide oder Fusionsproteine kodieren, die z.B. einer einfacheren Reinigung dienen. Derartige geeignete Modifikationen sind beispielsweise als Anker fungierende sogenannte "Tags", wie z.B. die als Hexa-Histidin-Anker bekannte Modifikation oder Epitope, die als Antigene von Antikörpern erkannt werden können (beschrieben zum Beispiel in Harlow, E. and Lane, D., 1988, Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor (N.Y.) Press). Diese Anker können zur Anheftung der Proteine an einen festen Träger, wie z.B. einer Polymermatrix, dienen, die beispielsweise in einer Chromatographiesäule eingefüllt sein kann, oder an einer Mikrotiterplatte oder an einem sonstigen Träger verwendet werden kann.

Gleichzeitig können diese Anker auch zur Erkennung der Proteine verwendet werden. Zur Erkennung der Proteine können außerdem übliche Marker, wie Fluoreszenzfarbstoffe, Enzymmarker, die nach Reaktion mit einem Substrat ein detektierbares Reaktionsprodukt bilden, oder radioaktive Marker, allein oder in Kombination mit den Ankern zur Derivatisierung der Proteine verwendet werden.

f) Reinigung des gewünschten Sialisierungsproduktes aus der Kultur

Die Gewinnung des gewünschten Produktes aus dem Mikroorganismus oder aus dem Kulturüberstand kann durch verschiedene, im Fachgebiet bekannte Verfahren erfolgen. Wird das gewünschte Produkt von den Zellen nicht sezerniert, können die Zellen aus der Kultur durch langsame Zentrifugation geerntet werden, die Zellen können durch Standard-Techniken, wie mechanische Kraft oder Ultraschallbehandlung, lysiert werden. Die Zelltrümmer werden durch Zentrifugation entfernt, und die Überstandsfraction, die die löslichen Proteine enthält, wird zur weiteren Reinigung der gewünschten Verbindung erhalten. Wird das Produkt von

den Zellen sezerniert, werden die Zellen durch langsame Zentrifugation aus der Kultur entfernt, und die Überstandsfraktion wird zur weiteren Reinigung behalten.

Die Überstandsfraktion aus beiden Reinigungsverfahren kann einer
5 Chromatographie mit einem geeigneten Harz unterworfen werden, wobei das gewünschte Molekül mit höherer Selektivität als die Verunreinigungen entweder auf dem Chromatographieharz zurückgehalten wird oder dieses passiert. Diese Chromatographieschritte können nötigenfalls wiederholt werden, wobei die gleichen oder andere Chromatographieharze verwendet werden. Der Fachmann ist in der
10 Auswahl der geeigneten Chromatographieharze und ihrer wirksamsten Anwendung für ein bestimmtes zu reinigendes Molekül bewandert. Das gereinigte Produkt kann durch Filtration oder Ultrafiltration konzentriert und bei einer Temperatur aufbewahrt werden, bei der die Stabilität des Produktes maximal ist.

15 Im Stand der Technik sind viele Reinigungsverfahren bekannt. Diese Reinigungstechniken sind z.B. beschrieben in Bailey, J.E. & Ollis, D.F. Biochemical Engineering Fundamentals, McGraw-Hill: New York (1986).

Die Identität und Reinheit der isolierten Verbindungen kann durch Techniken des
20 Standes der Technik bestimmt werden. Diese umfassen Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC), spektroskopische Verfahren, Färbeverfahren, Dünnschichtchromatographie, NIRS, Enzymtest oder mikrobiologische Tests. Diese Analyseverfahren sind z.B. zusammengefaßt in: Patek et al. (1994) Appl. Environ. Microbiol. 60:133-140; Malakhova et al. (1996) Biotekhnologiya 11 27-32; und
25 Schmidt et al. (1998) Bioprocess Engineer. 19:67-70. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1996) Bd. A27, VCH: Weinheim, S. 89-90, S. 521-540, S. 540-547, S. 559-566, 575-581 und S. 581-587; Michal, G (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley and Sons; Fallon, A. et al. (1987) Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in
30 Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17.

Folgende nichtlimitierende Beispiele beschreiben spezielle Ausführungsformen der Erfindung.

Beispiele der Herstellung, Reinigung und Verwendung der hier beanspruchten

Trans-Sialidasen

Allgemeines:

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) a.a.O. beschrieben durchgeführt.

Beispiel 1: Isolation der Enzyme aus Kulturen von *Trypanosoma congolense*

Die prozyklischen Formen von *Trypanosoma congolense* (hinterlegt beim Schweizer Tropeninstitut Basel (STIB) als Stamm Nr. 249) können bei 27°C ohne CO₂ in SM/SDM 79 Medium, welches 10% fötales Kälberserum und Hemin enthält, angezüchtet werden. Nach drei bis vier Tagen ist die Zellzahl von 1×10^6 auf ca. 7×10^6 /ml angewachsen und der Kulturüberstand wird durch Zentrifugation abgetrennt, filtriert und durch Ultrafiltration konzentriert. In dem so gewonnenen Kulturüberstand können 84% der Enzymaktivität festgestellt werden, während noch 16% der Enzyaktivität gebunden an das Zellpellet detektiert werden können. Die konzentrierten Kulturüberstände werden direkt als Enzymkonzentrat für die Trans-Sialidase Reaktionen eingesetzt. Die gewünschten sialisierten Moleküle werden nach der Reaktion aus dem Kulturüberstand isoliert.

Beispiel 2: Reinigung der Enzyme

Zur Isolierung reiner Enzyme wird der konzentrierte Kulturüberstand auf eine Ionenaustauschsäule (Q Sepharose) gegeben. Die Säule wird nach dem Waschen mit einem Salzgradienten eluiert. TS2 eluiert mit einer Salzkonzentration bis 0,2M, TS1 mit einem Salzgradienten ab 0,2M. Nach der Elution werden die beiden Enzyme
5 getrennt mittels Isoelektrischer Fokussierung, Gelfiltration (Sephades G150 SF), Affinitätschromatographie oder Proteinfällung bis zur apparenten Homogenität aufgereinigt.

Beispiel 3: Bestimmung der Enzymaktivität

10 Zur Bestimmung der Transferaktivität der Trans-Sialidase werden 25µl Enzymlösung in 50 mM BisTris Puffer, pH7,0, zusammen mit 1 mM Neu5Ac- α (2-3)lactose als Donor und 0,5 mM 4-Methylumbelliferyl-galactosid als Akzeptor in einem Endvolumen von 50µl bei 37°C für 2h inkubiert. Die Inkubation wird durch Zugabe
15 von 1 ml eiskaltem Wasser abgestoppt. Anschliessend wird der Reaktionsansatz auf vorher mit 0,3 ml Q Sepharose FF (Acetatform) gefüllte und mit Wasser preequilibrierte Säulen gegeben. Nach dem Auswaschen des Akzeptors mit Wasser und dem Verwerfen des Totvolumens (200 µl 1N HCl), wird das sialylierte Produkt mit 1N HCl eluiert (700µl). Nach saurer Hydrolyse des Produktes bei 95°C für 45 min
20 und Abkühlung auf Eis, wird die Probe mit 250-290µl 2 N NaOH und 300µl 1 M Glycin/NaOH Puffer pH 10,0 neutralisiert. Die Fluoreszenz des freigesetzten Methylumbelliferons wird in schwarzen 96-well-plates (Microfluor, Dynex, U.S.A.) bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm gemessen. Die Aktivität des Enzyms entspricht der Intensität der gemessenen
25 Fluoreszenz und kann an einer zuvor erstellten Eichkurve abgelesen werden (Methode nach Engstler et al. 1992).

Beispiel 4: Herstellung transgener Produktionsorganismen (Bakterien, Hefen, Pilzen, Pflanzen) für die Enzyme

30 Die hier erstmals beschriebenen DNS-Teilsequenzen von TS1 und TS2 ermöglichen mittels routinemäßig angewandten Standardtechniken die vollständige DNS-

Sequenzen der Enzyme zu erstellen (insbesondere, da die hier vorgestellten DNS-Sequenzen keine nicht codierenden Introns enthalten). Die entsprechenden Standardtechniken sind z. B. die „Polymerase-Chain-Reaction“ Technik (PCR-Technik), „Southern-Blott“ über die genomische DNS oder cDNS und mRNA-Techniken, die mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Kits beispielsweise von den Firmen Invitrogen oder Clontech durchgeführt werden können. Die Techniken sind dem Fachmann bekannt und sind unter anderem beschrieben in: Ausubel et al: Current Protocols in Molecular Biology, Edition 1989 und 2001. Die vollständige DNS der jeweiligen Enzyme oder funktionelle Teilsequenzen daraus werden mittels standard Transformationstechniken (Ausubel et al.) in die gewünschten Produktionsorganismen eingebracht. Die transgenen Organismen produzieren TS1 und TS2 und können aus den transgenen Organismen und/oder deren Kulturüberständen isoliert werden. Als Empfängerorganismen der DNS, die TS1 oder TS2 kodiert, kommen prokaryontische Bakterien, eukaryontische Mikroorganismen, Hefen und andere Pilze, eukaryontische Zellkulturen, Algen, Pflanzen, Samen, Tiere, Teile von Tieren, Gewebe, Hybridome, transgene Organismen und genbiologische, gentherapeutische und transgene Rekombinanten sowie davon abgeleitete Organismen, Organe, Gewebe und Zellen zum Einsatz. Die hier beanspruchten Enzyme können aus den entsprechenden Ganzen oder Teilen von transgenen Organismen, aus ihren Kulturüberständen, aus Organen, Gewebe, Zellen, biologische Flüssigkeiten, Exsudaten, Eiern, Blut, Lymphe, Milch, Pflanzen, Algen und Samen sowie aus Teilen davon isoliert werden.

Beispiel 5: Reaktionsbeispiel der Enzyme

25

6kg von Glycomakropeptid (GMP) werden zusammen mit 1kg Galaktooligosaccharide mit einer Kettenlänge von 6-10 Zucker in handelsüblichem 50mM Bis Tris Puffer pH 7,0 (z. B. von der Firma Merk, Darmstadt) gelöst. Die Lösung wird mit 1 Liter des Trans-Sialidase enthaltenden Kulturüberstandes von Trypanosoma congolense versetzt und bei 37°C 3 Stunden lang inkubiert. Nach diesem Zeitraum hat die Trans-Sialidase Sialinsäuren von dem GMP auf die Galaktooligosaccharide übertragen. Die sialisierten Produkte können mit Hilfe

30

üblicher chromatographischer Methoden (Ausubel et al.) oder Filtertechniken abgetrennt und gereinigt werden und stehen in reinem Zustand für Produktformulierungen zur Verfügung.

- 5 Glycomakropeptid (GMP) ist ein Abfallprodukt der Käseherstellung aus Kuhmilch. Nach Fällung des Caseins für die Käsezubereitung kann es aus der verbleibenden Molke mittels Filtertechniken isoliert werden.

- 10 Galaktooligosaccharide werden hergestellt, indem Laktose mittels des im Handel erhältlichen Enzyms beta-Galaktosidase umgesetzt wird. Bei dieser Umsetzung spaltet beta-Galaktosidase einerseits die Laktose in seine monomeren Zucker. Andererseits entstehen bei dieser Umsetzung in einer Nebenreaktion auch längerkettige Galaktooligosaccharide, die abgetrennt werden können und dann als Akzeptoren für die Trans-Sialidase Reaktion zur Verfügung stehen.

15

Beispiel 6: Verwendung der Enzyme

- Die beiden isolierten Enzyme können beispielsweise zur Sialylierung von beta-Galaktose enthaltene Polymere (wie *Gum arabicum* etc.) und insbesondere für
20 Poylactosamine und Galactane sowie für Galaktooligosaccharide (GOS), insbesondere für beta-Galakto-Oligosaccharide, wie z. B. *Vivinal* GOS von der Firma *Borculo Domo Ingredients* (BDI) und *Oligomate 55* von der Firma *Yakult* eingesetzt werden.

- 25 Diese polymeren Galaktose-Zucker und neu gebildete Galaktooligosaccharide (Herstellung wie in Beispiel 5 beschrieben) können mit Hilfe der in diesem Patent beanspruchten Trans-Sialidasen sialyliert werden. Als Donoren für die Sialinsäuren können alle oben erwähnten Donoren und insbesondere das Glykomakropeptid aus Caseinen (von Mensch, Kuh, Ziege, Schaf, Pferd, Kamel und anderen Tieren) zum
30 Einsatz kommen. Sialisierte Zuckerstrukturen weisen eine erhöhte Ähnlichkeit zu sauren Zuckern auf, die auch im menschlichen Körper gefunden werden können und dort vielfältige Aufgaben haben.

Literatur

- 5 Blix, F. G., Gottschalk, A. und Klenk, E. (1957). Proposed nomenclature in the field of neuraminic and sialic acids. *Nature* 179: 1088
- Chuenkova M., Pereira M., (1999). Taylor G. trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi*: Location of galactose-binding site(S). *BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN*; 262: 549-556.
- 10 Chuenkova M.V., Pereira M.A. (2001). The *T. cruzi* trans-sialidase induces PC12 cell differentiation via MAPK/ERK pathway. *Neuroreport* 12: 3715-3718.
- Corfield A.P., Myerscough N., Warren B.F., Durdey P., Paraskeva C. and Schauer R. (1999). Reduction of sialic acid O-acetylation in human colon mucins in the adenoma-carcinoma sequence, *Glycoconjugate J.* 16: 307-317
- 15 Crocker, P. R., Clark, E. A., Filbin, M., Gordon, S., Jones, Y., Kehrl, J. H., Kelm, S., Le Douarin, N., Powell, L., Roder, J., Schnaar, R. L., Sgroi, D. C., Stamenkovic, K., Schauer, R., Schachner, M., van den Berg, T. K., van der Merwe, P. A., Watt, S. M. und Varki, A. (1998). Siglecs: a family of sialic-acid binding lectins. *Glycobiology* 8, v.
- 20 Engstler, M., Reuter, G. und Schauer, R. (1992). Purification and characterization of a novel sialidase found in procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 54: 21-30.
- Engstler M., Reuter G., Schauer R. (1993). The developmentally regulated trans-sialidase from *Trypanosoma brucei* sialylates the procyclic acidic repetitive protein. *Mol Biochem Parasitol*; 61: 1-13.
- 25 Engstler M., Schauer R., Brun R. (1995). Distribution of developmentally regulated trans-sialidases in the Kinetoplastida and characterization of a shed trans-sialidase activity from procyclic *Trypanosoma congolense*. *Acta Trop*; 59: 117-129.
- Fahr C. and Schauer R. (2001). Detection of Sialic Acids and Gangliosides with Special Reference to 9-O-Acetylated Species in Basaliomas and Normal Human
- 30 Skin, *J. Invest. Dermatol.* 116: 254-260

- Gao W, Pereira MA. (2001). Trypanosoma cruzi trans-sialidase potentiates T cell activation through antigen-presenting cells: role of IL-6 and Bruton's tyrosine kinase. *Eur J Immunol* 31: 1503-1512.
- Herrler, G., Rott, R., Klenk, H. D., Müller, H. P., Shukla, A. K. und Schauer, R.
5 (1985). The receptor-destroying enzyme of influenza C virus is neuraminate-O-acetyl-esterase. *EMBO J.* 4, 1503-1506.
- Higa, H. H., Rogers, G. N. und Paulson, J. C. (1985). Influenza virus hemagglutinins differentiate between receptor determinants bearing N-acetyl-, N-glycolyl-, and N,O-diacetyl-neuraminic acids. *Virology* 144: 279-282.
- 10 Hubl U., Ishida H., Kiso M., Hasegawa A., and Schauer R. (2000). Studies on the Specificity and Sensitivity of the Influenza C Virus Binding Assay for O-Acetylated Sialic Acids and Its Application to Human Melanomas, *J. Biochem.* 127: 1021-1031
- Kelm, S. und Schauer, R. (1997). Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Int. Rev. Cytol.* 175: 137-240.
- 15 Kelm, S., Schauer, R. und Crocker, P. R. (1996). The Sialoadhesins - a family of sialic acid-dependent cellular recognition molecules within the immunoglobulin superfamily. *Glycoconj. J.* 13: 913-926.
- Lasky, L. A. (1995). Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Ann. Rev. Biochem.* 64, 113-139.
- 20 Mattos-Guaraldi, A.L., Formiga, L.C.D. and Andrade, A.F.B. (1998). *FEMS Microbiology Letters*, 168: 167-172
- Medina-Acosta E., Paul S., Tomlinson S., Pontes-de-Carvalho L.C. (1994). Combined occurrence of trypanosomal sialidase/trans-sialidase activities and leishmanial metalloproteinase gene homologues in *Endotrypanum* sp. *Mol Biochem Parasitol*; 64: 273-282.
- 25 Montagna G, Cremona ML, Paris G, Amaya MF, Buschiazzi A, Alzari PM, Frasch AC (2002). The trans-sialidase from the african trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Eur J Biochem*; 269: 2941-2950.

Pilatte, Y., Bignon, J. und Lambré, C. R. (1993). Sialic acids as important molecules in the regulation of the immune system: pathophysiological implications of sialidases in immunity. *Glycobiology* 3: 201-218.

Pontes de Carvalho L.C., Tomlinson S., Vandekerckhove F., Bienen E.J., Clarkson
5 A.B., Jiang M.S., Hart G.W., Nussenzweig V. (1993). Characterization of a novel trans-sialidase of *Trypanosoma brucei* procyclic trypomastigotes and identification of procyclin as the main sialic acid acceptor. *J Exp Med*; 177: 465-474.

Reuter, G. und Schauer, R. (1988). Nomenclature of sialic acids. *Glycoconj. J.* 5: 133-135.

10 Reuter, G., Kelm, S. und Schauer, R. (1988). Chemistry and biology of cell surface glyco-conjugates. *Acta Histochem. Suppl.* 36: 51-79.

Schauer R. (2000), Achievements and challenges of sialic acid research, *Glycoconjugate J.* 17: 485-499

Schauer, R. (1982). Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids.
15 *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 40: 131-234.

Schauer, R. (1985). Sialic acids and their role as biological masks. *Trends Biochem. Sci.* 10, 357-360.

Schauer, R. (1991). Biosynthesis and function of N- and O-substituted sialic acids. *Glyco-biology* 1: 449-452.

20 Schauer, R. und Kamerling, J. P. (1997). Chemistry, biochemistry and biology of sialic acids. *In Glycoproteins II.* J. Montreuil, J. F. G. Vliegenthart, und H. Schachter, eds. (Amsterdam: Elsevier), pp. 243-402.

Schauer, R., Kelm, S., Reuter, G., Roggentin, P. und Shaw, L. (1995). Biochemistry and role of sialic acids. *In Biology of sialic acids.* A. Rosenberg, ed. (New York:
25 Plenum Press), pp. 7-67.

Schenkman, S., Jiang, M. S., Hart, G. W. und Nussenzweig, V. (1991). A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell* 65: 1117-1125.

Sharon, N. und Lis, H. (1997). Microbial lectins and their glycoprotein receptors. *In* Glyco-proteins II. J. Montreuil, J. F. G. Vliegthart und H. Schachter, eds. (Amsterdam: Elsevier), pp. 475-506.

Shaw, L. und Schauer, R. (1988). The biosynthesis of N-glycoloylneuraminic acid occurs by hydroxylation of the CMP-glycoside of N-acetylneuraminic acid. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 369: 477-486.

Tertov V.V., Kaplun V.V., Sobenin I.A., Boytsova, E.Y., Bovin N.V. & Orekhov A.N. (2001). Human plasma trans-sialidase causes atherogenic modification of low density lipoprotein. *Atherosclerosis* 159: 103-115

Traving, C. und Schauer, R. (1998). Structure, function and metabolism of sialic acids. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 54: 1330-1349.

Varki, A., Hooshmand, F., Diaz, S., Varki, N. M. und Hedrick, S. M. (1991). Developmental abnormalities in transgenic mice expressing a sialic acid-specific 9-O-acetylase. *Cell* 65: 65-74.

PATENTANSPRÜCHE

- 5 1. Polynukleotid, welches für ein Protein mit Trans-Sialidase-Aktivität kodiert und aus *Trypanosoma congolense* isolierbar ist.
2. Polynukleotid nach Anspruch 1, welches für ein Protein mit Trans-Sialidase-Aktivität kodiert, das den Transfer von Sialinsäure von einem Donor auf ein Akzeptormolekül katalysiert.
- 10 3. Polynukleotid, nach Anspruch 1 oder 2, umfassend eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1 oder 3, oder Fragmente davon, welche wenigstens 15 zusammenhängende Nukleotidreste umfassen; die dazu komplementären Polynukleotide und Fragmente; und die von diesen Polynukleotiden durch Entartung des genetischen Codes abgeleiteten
15 Nukleotidsequenzen.
4. Oligonukleotid, welches mit einem Polynukleotid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, insbesondere unter stringenten Bedingungen, hybridisiert.
5. Polynukleotid, welches mit einem Oligonukleotid nach Anspruch 4,
20 insbesondere unter stringenten Bedingungen, hybridisiert und für ein Genprodukt aus Mikroorganismen der Gattung *Trypanosoma* kodiert.
6. Polypeptid, welches von einem Polynukleotid kodiert wird, das eine Nukleinsäuresequenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 oder 5 umfasst; oder welches eine Aminosäuresequenz aufweist, die wenigstens 10
25 zusammenhängende Aminosäuren gemäß SEQ ID NO: 2 oder 4 umfasst; sowie funktionale Äquivalente davon, welche Trans-Sialidase-Aktivität besitzen.
7. Trans-Sialidase oder funktionale Äquivalente davon mit Trans-Sialidase-Aktivität, gekennzeichnet durch eine der folgenden

Aminosäureteilsequenzen:

TDTVAKYSTDGGRTWKREVIIPNGR (Pos. 1 bis 25 gemäß SEQ ID NO:2)

FRIPSLVEIDGVLIATFDTRYLRASDSSLI (Pos. 1 bis 30 gemäß SEQ ID NO:4).

- 5 8. Trans-Sialidase 1 (TS1) gekennzeichnet durch wenigstens eines der folgenden Charakteristika:

Nukleotidsequenz	SEQ ID NO:1
Aminosäuresequenz	SEQ ID NO:2
Temperaturoptimum	30-40°C
pH Optimum	pH 6.5-8.5
Isoelektrischer Punkt	pH 4-5
Molekulargewicht nativ	400-600 kDa
Molekulargewicht im reduzierenden SDS- page	90 kDa

9. Trans-Sialidase 2 (TS2), gekennzeichnet durch wenigstens eines der folgenden Charakteristika:

Nukleotidsequenz	SEQ ID NO:3
Aminosäuresequenz	SEQ ID NO:4
Temperaturoptimum	30-40°C
pH Optimum	pH 6.5-8.5
Isoelektrischer Punkt	pH 5-6
Molekulargewicht nativ	120-180 kDa
Molekulargewicht im reduzierenden SDS- page	90 kDa

10. Stoff nach einem der Ansprüche 1 bis 9, abgeleitet aus dem Organismus *Trypanosoma congolense*.

11. Stoffe nach einem der Ansprüche 1 bis 9, hergestellt unter Anwendung synthetischer, insbesondere chemischer, biochemischer, enzymatischer, gentechnologischer und transgener Methoden.

12. Funktionales Äquivalent einer Trans-Sialidase nach einem der Ansprüche 8 und 9, deren Aminosäuresequenz oder -teilsequenz zur korrespondierenden Aminosäuresequenz oder -teilsequenz gemäß SEQ ID NO: 2 oder 4 eine Sequenzidentität von wenigsten 50 % oder wenigstens 60 %, insbesondere wenigstens 65 % oder wenigstens 70 %, wie z.B. 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% oder 99%, berechnet nach dem Algorithmus von Pearson und Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85(8), 1988, 2444-2448, aufweist; oder das eine oder mehrere Deletionen, Additionen, Substitutionen oder Inversionen einzelner oder mehrerer Aminosäurereste enthält oder ein verändertes Glykosylierungsmuster zeigt; wobei die Befähigung zur Katalyse der Übertragung von Sialinsäuren von einem Donor auf einen Akzeptor erhalten bleibt.

13. Expressionskassette, umfassend in operativer Verknüpfung mit wenigstens einer regulativen Nukleinsäuresequenz eine Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 5.

14. Rekombinanter Vektor, umfassend wenigstens eine Expressionskassette nach Anspruch 13.

15. Prokaryotischer oder eukaryotischer Wirt, transformiert mit wenigstens einem Vektor nach Anspruch 14.

16. Verwendung einer Expressionskassette nach Anspruch 13, eines Vektors nach Anspruch 14 oder eines Wirts nach Anspruch 15 zur rekombinanten Herstellung eines Proteins mit Trans-Sialidase-Aktivität.

17. Verfahren zur enzymatischen Sialisierung eines Akzeptormoleküls, dadurch gekennzeichnet, dass man das Akzeptormolekül mit einem Sialinsäurereste enthaltenden Donor in Gegenwart eines Enzyms nach einem der Ansprüche 6 bis 12 inkubiert und den sialylierten Akzeptor isoliert.

18. Verfahren nach Anspruch 17, gekennzeichnet durch wenigsten eine weitere der folgenden Eigenschaften:

a) der Donor ist ausgewählt unter an Oligosaccharide, Polysaccharide, Polysialinsäuren, Glykoproteine und Glykolipide gebundene Sialinsäuren, wie insbesondere Lactoferrine, glykolisierte Molkenproteine und Caseine und Fragmente davon;

b) der Akzeptor ist ausgewählt unter β -Galaktose enthaltenden Polymeren, wie β -Galaktooligosacchariden, Laktitol, Laktobionsäure, Methyl- β -lactosid, Acetyllaktosaminen, Galaktopyranosiden, Trans-Galaktooligosacchariden, Polygalaktose und anderen Glykokonjugaten mit endständig gebundener β (1-3) oder β (1-4)-Galaktose oder Galaktose.

19. Verwendung einer Trans-Sialidase nach einem der Ansprüche 6 bis 12, einer dafür kodierenden Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder eines nach einem der Ansprüche 18 und 19 hergestellten Sialisierungsprodukts zur Herstellung eines Medikaments, Nahrungsmittels oder Nahrungsergänzungsmittels oder einer Nahrungsmittelzutat zur Prävention oder Behandlung Sialinsäure-gesteuerter parasitärer, bakterieller oder viraler Infektionen; zur Behandlung von Tumorerkrankungen; zur Behandlung von Erkrankungen, welche mit einer Entwicklungsstörung des Gewebes assoziiert sind; zur Behandlung von Erkrankungen des Immunsystems; zur Behandlung von Autoimmunreaktionen; zur Behandlung von Erkrankungen mit gestörter Zellkommunikation; oder zur Behandlung von Entzündungen.

20. Verwendung einer Trans-Sialidase nach einem der Ansprüche 6 bis 12, zur Entwicklung eines Trypanosomiasis-Impfstoffs oder zur Entwicklung

von Enzyminhibitoren zur Behandlung oder Prävention von Trypanosoma-Infektionen.

21. Verwendung einer Trans-Sialidase nach einem der Ansprüche 6 bis 12, einer dafür kodierenden Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder eines nach einem der Ansprüche 18 und 19 hergestellten sialylierten Produkts zur Herstellung eines Medikaments, Nahrungsergänzungsmittels oder Nahrungsmittels zur Schutz körpereigener Zellen oder Gewebe oder Glykoproteine vor enzymatischer Einwirkung.

22. Verwendung einer Trans-Sialidase nach einem der Ansprüche 6 bis 12, einer dafür kodierenden Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder eines nach einem der Ansprüche 17 und 18 hergestellten sialylierten Produkts zur Herstellung eines Medikaments, Nahrungsergänzungsmittels oder Nahrungsmittels zu Beeinflussung der Entwicklung und/oder Morphogenese von Körpergeweben.

23. Effektor der Trans-Sialidase-Aktivität einer Trans-Sialidase nach einem der Ansprüche 6 bis 12, ausgewählt unter

- a) Polypeptid-Liganden, welche mit einer Trans-Sialidase nach einem der Ansprüche 6 bis 12 wechselwirken;
- b) niedermolekularen Effektoren, welche die biologische Aktivität einer Trans-Sialidase nach einem der Ansprüche 6 bis 12 modulieren; und
- c) Antisense-Nukleinsäuresequenzen zu einer Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 5.

24. Verwendung eines Effektors nach Anspruch 23 zur Herstellung eines pharmazeutisches oder gentherapeutisches Mittels, Nahrungsergänzungsmittels oder Nahrungsmittels zur Behandlung oder Prävention von mit Trans-Sialidase-Aktivität assoziierten Erkrankungen.

25. Verfahren zur Isolierung eines Enzyms mit Trans-Sialidase-Aktivität, wobei man

- a) *Trypanosoma congolense* in einem Medium kultiviert,

b) und das gewünschte Produkt aus dem Kulturüberstand durch *Ionenaustauschchromatographie* mit Hilfe eines Salzgradienten, gegebenenfalls gefolgt von Isoelektrischer Fokussierung, Gelfiltration, Affinitätschromatographie und/oder Proteinfällung, isoliert.

5

26. Pharmazeutisches oder gentherapeutisches Mittel, enthaltend in einem pharmazeutisch oder gentherapeutisch verträglichen Träger wenigsten einen Effektor nach Anspruch 23.

[illegible]

Bild 2**Sialidase****Hydrolyse von Donor gebundenen Sialinsäuren****Sialyltransferase****Transfer von mit C M P aktivierten Sialinsäuren auf Akzeptormoleküle****Trans-sialidase****Transfer von Sialinsäuren von Donor auf Akzeptormoleküle**

T.r.8 :-----*-----20-----*-----40-----*-----60-----*-----80-----*-----100-----*-----120-----
 T.cr.78 :-----*-----20-----*-----40-----*-----60-----*-----80-----*-----100-----*-----120----- : 44
 T.b.br.78 : HEBLEHQNRHPIGRLLILPFAVCHCCALTSKAAKGTREAPLGGGAWALKKLEKDGVEWVWODGPNWKDKYDKEVERUPKBEKFGGGSEKRSRUPFRNTGGYTLGRTKLSSAIE : 53
 T.con.781 :-----*-----20-----*-----40-----*-----60-----*-----80-----*-----100-----*-----120----- : 120
 T.con.782 :-----*-----20-----*-----40-----*-----60-----*-----80-----*-----100-----*-----120----- : -

T.r.8 :-----*-----140-----*-----160-----*-----180-----*-----200-----*-----220-----*-----240-----
 T.cr.78 : SNGTIRSRVSRSGRTIWDVSHVATADARPSFDRSEAVSEVSDAANDNDOTAHIS-RASSVSEADAPIMVKKKLOHSTFRTNPFQHRD---GSESEELLVVE : 160
 T.b.br.78 : KGGKVFSEVVRHETLALANVSEVVALADARFENDNELLIVASVINDSEETQOARKHS-RASSVSEADAPIMVKKKLOHSTFRTNPFQHRD---GSESEELLVVE : 169
 T.con.781 : GSDKV-ETVVRHETLALANVSEVVALADARFENDNELLIVASVINDSEETQOARKHS-RASSVSEADAPIMVKKKLOHSTFRTNPFQHRD---GSESEELLVVE : 239
 T.con.782 :-----*-----140-----*-----160-----*-----180-----*-----200-----*-----220-----*-----240----- : 79
 T.con.782 :-----*-----140-----*-----160-----*-----180-----*-----200-----*-----220-----*-----240----- : 105

T.r.8 :-----*-----260-----*-----280-----*-----300-----*-----320-----*-----340-----*-----360-----
 T.cr.78 :-----*-----260-----*-----280-----*-----300-----*-----320-----*-----340-----*-----360----- : 272
 T.b.br.78 :-----*-----260-----*-----280-----*-----300-----*-----320-----*-----340-----*-----360----- : 281
 T.con.781 :-----*-----260-----*-----280-----*-----300-----*-----320-----*-----340-----*-----360----- : 356
 T.con.782 :-----*-----260-----*-----280-----*-----300-----*-----320-----*-----340-----*-----360----- : 191
 T.con.782 :-----*-----260-----*-----280-----*-----300-----*-----320-----*-----340-----*-----360----- : 220

T.r.8 :-----*-----380-----*-----400-----*-----420-----*-----440-----*-----460-----*-----480-----
 T.cr.78 :-----*-----380-----*-----400-----*-----420-----*-----440-----*-----460-----*-----480----- : 383
 T.b.br.78 :-----*-----380-----*-----400-----*-----420-----*-----440-----*-----460-----*-----480----- : 392
 T.con.781 :-----*-----380-----*-----400-----*-----420-----*-----440-----*-----460-----*-----480----- : 476
 T.con.782 :-----*-----380-----*-----400-----*-----420-----*-----440-----*-----460-----*-----480----- : 304
 T.con.782 :-----*-----380-----*-----400-----*-----420-----*-----440-----*-----460-----*-----480----- : 277

T.r.8 :-----*-----500-----*-----520-----*-----540-----*-----560-----*-----580-----*-----600-----
 T.cr.78 :-----*-----500-----*-----520-----*-----540-----*-----560-----*-----580-----*-----600----- : 502
 T.b.br.78 :-----*-----500-----*-----520-----*-----540-----*-----560-----*-----580-----*-----600----- : 511
 T.con.781 :-----*-----500-----*-----520-----*-----540-----*-----560-----*-----580-----*-----600----- : 592
 T.con.782 :-----*-----500-----*-----520-----*-----540-----*-----560-----*-----580-----*-----600----- : 419

T.r.8 :-----*-----620-----*-----640-----*-----660-----*-----680-----*-----700-----*-----720-----
 T.cr.78 :-----*-----620-----*-----640-----*-----660-----*-----680-----*-----700-----*-----720----- : 620
 T.b.br.78 :-----*-----620-----*-----640-----*-----660-----*-----680-----*-----700-----*-----720----- : 629
 T.con.781 :-----*-----620-----*-----640-----*-----660-----*-----680-----*-----700-----*-----720----- : 711
 T.con.782 :-----*-----620-----*-----640-----*-----660-----*-----680-----*-----700-----*-----720----- : 497

T.r.8 :-----*-----740-----*-----760-----*-----780-----*-----800-----*-----820-----*-----840-----
 T.cr.78 :-----*-----740-----*-----760-----*-----780-----*-----800-----*-----820-----*-----840----- : 660
 T.b.br.78 :-----*-----740-----*-----760-----*-----780-----*-----800-----*-----820-----*-----840----- : 749
 T.con.781 :-----*-----740-----*-----760-----*-----780-----*-----800-----*-----820-----*-----840----- : 831
 T.con.782 :-----*-----740-----*-----760-----*-----780-----*-----800-----*-----820-----*-----840----- : -

T.r.8 :-----*-----860-----*-----880-----*-----900-----*-----920-----*-----940-----*-----960-----
 T.cr.78 :-----*-----860-----*-----880-----*-----900-----*-----920-----*-----940-----*-----960----- : 869
 T.b.br.78 :-----*-----860-----*-----880-----*-----900-----*-----920-----*-----940-----*-----960----- : 874
 T.con.781 :-----*-----860-----*-----880-----*-----900-----*-----920-----*-----940-----*-----960----- : -
 T.con.782 :-----*-----860-----*-----880-----*-----900-----*-----920-----*-----940-----*-----960----- : -

T.r.8 :-----*-----980-----*-----1000-----*-----1020-----*-----1040-----*-----1060-----*-----1080-----
 T.cr.78 :-----*-----980-----*-----1000-----*-----1020-----*-----1040-----*-----1060-----*-----1080----- : 989
 T.b.br.78 :-----*-----980-----*-----1000-----*-----1020-----*-----1040-----*-----1060-----*-----1080----- : -
 T.con.781 :-----*-----980-----*-----1000-----*-----1020-----*-----1040-----*-----1060-----*-----1080----- : -
 T.con.782 :-----*-----980-----*-----1000-----*-----1020-----*-----1040-----*-----1060-----*-----1080----- : -

T.r.8 :-----*-----1100-----*-----1120-----*-----1140-----*-----
 T.cr.78 :-----*-----1100-----*-----1120-----*-----1140-----*----- : 1060
 T.b.br.78 :-----*-----1100-----*-----1120-----*-----1140-----*----- : -
 T.con.781 :-----*-----1100-----*-----1120-----*-----1140-----*----- : -
 T.con.782 :-----*-----1100-----*-----1120-----*-----1140-----*----- : -

Trans-Sialidasen.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Numico, B. V.
Schmitt, Joachim
Boehm, Günther
Stahl, Bernd
Schauer, Roland
Tiralongo, Evelin
Schrader, Silke

<120> Trans-Sialidasen aus Trypanosoma congolense

<130> NUT-047-WO

<150> DE 10258400.1

<151> 2002-12-13

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1491

<212> DNA

<213> Trypanosoma congolense

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1491)

<223>

<400> 1

acc	gac	acc	gtt	gct	aaa	tac	agc	act	gac	ggt	ggg	aga	acg	tgg	aag	48
Thr	Asp	Thr	Val	Ala	Lys	Tyr	Ser	Thr	Asp	Gly	Gly	Arg	Thr	Trp	Lys	
1				5					10					15		

agg	gag	gtt	ata	att	ccg	aat	ggt	cgt	gtg	gat	gcc	cac	tac	tcc	cgc	96
Arg	Glu	Val	Ile	Ile	Pro	Asn	Gly	Arg	Val	Asp	Ala	His	Tyr	Ser	Arg	
			20					25					30			

gtc	gtt	gat	ccc	act	gtt	gtt	gcg	aag	ggt	aat	aac	att	tat	gtt	ctc	144
Val	Val	Asp	Pro	Thr	Val	Val	Ala	Lys	Gly	Asn	Asn	Ile	Tyr	Val	Leu	
		35					40					45				

gtt	ggg	cgg	tac	aat	gtc	acg	cgg	ggc	tac	tgg	cac	aat	agg	aac	aac	192
Val	Gly	Arg	Tyr	Asn	Val	Thr	Arg	Gly	Tyr	Trp	His	Asn	Arg	Asn	Asn	
	50					55					60					

aag	gct	ggc	ata	gcc	gat	tgg	gag	ccc	ttc	gtg	tac	aag	ggc	acg	gtg	240
Lys	Ala	Gly	Ile	Ala	Asp	Trp	Glu	Pro	Phe	Val	Tyr	Lys	Gly	Thr	Val	
65					70					75					80	

aac	gtg	ggc	acg	aag	ggc	aat	gcc	act	gat	gtg	tcg	atc	agc	tgg	gag	288
Asn	Val	Gly	Thr	Lys	Gly	Asn	Ala	Thr	Asp	Val	Ser	Ile	Ser	Trp	Glu	
				85					90					95		

agg	act	gca	ctg	aag	tcg	ctg	tac	aac	ttc	ccg	gtt	tcg	gga	agc	cct	336
Arg	Thr	Ala	Leu	Lys	Ser	Leu	Tyr	Asn	Phe	Pro	Val	Ser	Gly	Ser	Pro	
			100					105					110			

ggc	acg	cag	ttc	ctt	gga	ggg	gct	ggg	ggt	ggt	gtt	gta	aca	tcc	aac	384
Gly	Thr	Gln	Phe	Leu	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Thr	Ser	Asn	
		115					120					125				

ggg	acg	att	gtg	ctg	cca	gtg	cag	gca	agg	aac	aag	gcc	aac	cgt	gtt	432
Gly	Thr	Ile	Val	Leu	Pro	Val	Gln	Ala	Arg	Asn	Lys	Ala	Asn	Arg	Val	
		130				135					140					

Trans-Sialidasen.ST25.txt

gtg	agc	atg	atc	ctg	tac	tcg	gct	gac	gat	gga	aag	tca	tgg	cac	ttt	480
Val	Ser	Met	Ile	Leu	Tyr	Ser	Ala	Asp	Asp	Gly	Lys	Ser	Trp	His	Phe	
145					150					155					160	
ggg	aag	ggt	gag	gcc	ggt	gta	ggc	acg	tcc	gag	gct	gcc	ctc	act	gag	528
Gly	Lys	Gly	Glu	Ala	Gly	Val	Gly	Thr	Ser	Glu	Ala	Ala	Leu	Thr	Glu	
				165					170					175		
tgg	gac	ggc	aag	ctg	ctg	att	agt	gca	cga	tcc	gat	ggt	gga	cag	ggc	576
Trp	Asp	Gly	Lys	Leu	Leu	Ile	Ser	Ala	Arg	Ser	Asp	Gly	Gly	Gln	Gly	
			180					185					190			
tac	cgc	atg	ata	ttc	gaa	tcg	agt	gac	ctt	ggt	gcg	acg	tgg	aaa	gag	624
Tyr	Arg	Met	Ile	Phe	Glu	Ser	Ser	Asp	Leu	Gly	Ala	Thr	Trp	Lys	Glu	
		195					200					205				
atg	ctc	aac	agc	atc	tcc	cgc	gtg	att	ggc	aac	tct	ccg	ggt	cgc	agt	672
Met	Leu	Asn	Ser	Ile	Ser	Arg	Val	Ile	Gly	Asn	Ser	Pro	Gly	Arg	Ser	
	210					215					220					
ggt	cct	ggc	agc	tcg	agt	ggc	ttc	atc	acg	gtg	aca	gtg	gag	ggt	gtg	720
Gly	Pro	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Phe	Ile	Thr	Val	Thr	Val	Glu	Gly	Val	
225					230					235					240	
cct	gtg	atg	ctg	att	acc	cac	ccg	aag	aac	ctt	aag	ggc	tcg	tat	tat	768
Pro	Val	Met	Leu	Ile	Thr	His	Pro	Lys	Asn	Leu	Lys	Gly	Ser	Tyr	Tyr	
				245					250					255		
cgg	gac	cgt	ctg	cag	ctg	tgg	atg	acg	gac	ggc	aat	cgt	atg	tgg	cat	816
Arg	Asp	Arg	Leu	Gln	Leu	Trp	Met	Thr	Asp	Gly	Asn	Arg	Met	Trp	His	
			260					265					270			
gtc	ggg	cag	gtc	tct	gag	ggc	gac	gat	aac	agc	gct	tac	agc	tcc	ctg	864
Val	Gly	Gln	Val	Ser	Glu	Gly	Asp	Asp	Asn	Ser	Ala	Tyr	Ser	Ser	Leu	
		275					280					285				
ctg	tac	act	ccg	gac	ggg	gtc	ctg	tac	tgc	ttg	cat	gag	cag	aac	att	912
Leu	Tyr	Thr	Pro	Asp	Gly	Val	Leu	Tyr	Cys	Leu	His	Glu	Gln	Asn	Ile	
	290					295					300					
gat	gag	gtg	tac	agc	ctc	cac	ctt	gtg	cgc	ctt	gtg	gac	gag	ctg	aaa	960
Asp	Glu	Val	Tyr	Ser	Leu	His	Leu	Val	Arg	Leu	Val	Asp	Glu	Leu	Lys	
305					310					315					320	
agc	att	aaa	tca	acg	gct	ctg	gtg	tgg	aag	gca	cag	gac	gag	ctt	ctc	1008
Ser	Ile	Lys	Ser	Thr	Ala	Leu	Val	Trp	Lys	Ala	Gln	Asp	Glu	Leu	Leu	
				325					330					335		
ctg	ggc	aac	tgc	ctc	ccg	ggc	gat	aaa	tac	gat	ccc	ggg	tgt	gac	ggc	1056
Leu	Gly	Asn	Cys	Leu	Pro	Gly	Asp	Lys	Tyr	Asp	Pro	Gly	Cys	Asp	Gly	
			340					345					350			
atc	ccc	acc	gct	ggg	ctt	gcc	ggg	ctg	ctg	gta	gga	ccc	ctg	acg	gag	1104
Ile	Pro	Thr	Ala	Gly	Leu	Ala	Gly	Leu	Leu	Val	Gly	Pro	Leu	Thr	Glu	
		355					360					365				
aag	acg	tgg	ccc	gac	gcg	tat	cgg	tgc	gtg	aac	gct	gca	acc	agc	ggc	1152
Lys	Thr	Trp	Pro	Asp	Ala	Tyr	Arg	Cys	Val	Asn	Ala	Ala	Thr	Ser	Gly	
	370					375					380					
gct	gtg	agc	act	gct	gaa	ggc	gtg	cgg	ctg	gac	gtg	ggt	ggc	ggt	ggc	1200
Ala	Val	Ser	Thr	Ala	Glu	Gly	Val	Arg	Leu	Asp	Val	Gly	Gly	Gly	Gly	
385					390					395					400	
cat	gtt	gtg	tgg	ccc	gtg	agt	gag	cag	ggg	cag	gac	cag	cgg	tat	tac	1248
His	Val	Val	Trp	Pro	Val	Ser	Glu	Gln	Gly	Gln	Asp	Gln	Arg	Tyr	Tyr	
				405					410					415		

Trans-Sialidasen.ST25.txt

```

ttt acc aac agc gag ttc acg ctc gcc gtc acg gtg cgg ttt gac gag      1296
Phe Thr Asn Ser Glu Phe Thr Leu Ala Val Thr Val Arg Phe Asp Glu
420                               425                               430

atg cca cgg ggg gag ctc ccg ttg ctg ggg ttt gtg aac cgc aaa ggg      1344
Met Pro Arg Gly Glu Leu Pro Leu Leu Gly Phe Val Asn Arg Lys Gly
435                               440                               445

aag gtg aag aag ata ctg aag gtg tcg ctg agc ggg gtg gag tgg ctc      1392
Lys Val Lys Lys Ile Leu Lys Val Ser Leu Ser Gly Val Glu Trp Leu
450                               455                               460

ctg gca tac ggg aat gag tac aac agc aca gcc gct gag ccg ctg gac      1440
Leu Ala Tyr Gly Asn Glu Tyr Asn Ser Thr Ala Ala Glu Pro Leu Asp
465                               470                               475                               480

gtg aac gag agc cac cag gtg gtg cta gcg ctt cac gac ggg atc gtc      1488
Val Asn Glu Ser His Gln Val Val Leu Ala Leu His Asp Gly Ile Val
485                               490                               495

tcc
Ser
1491

```

<210> 2
 <211> 497
 <212> PRT
 <213> Trypanosoma congolense

<400> 2

Thr Asp Thr Val Ala Lys Tyr Ser Thr Asp Gly Gly Arg Thr Trp Lys
1 5 10 15

Arg Glu Val Ile Ile Pro Asn Gly Arg Val Asp Ala His Tyr Ser Arg
20 25 30

Val Val Asp Pro Thr Val Val Ala Lys Gly Asn Asn Ile Tyr Val Leu
35 40 45

Val Gly Arg Tyr Asn Val Thr Arg Gly Tyr Trp His Asn Arg Asn Asn
50 55 60

Lys Ala Gly Ile Ala Asp Trp Glu Pro Phe Val Tyr Lys Gly Thr Val
65 70 75 80

Asn Val Gly Thr Lys Gly Asn Ala Thr Asp Val Ser Ile Ser Trp Glu
85 90 95

Arg Thr Ala Leu Lys Ser Leu Tyr Asn Phe Pro Val Ser Gly Ser Pro
100 105 110

Gly Thr Gln Phe Leu Gly Gly Ala Gly Gly Gly Val Val Thr Ser Asn
115 120 125

Gly Thr Ile Val Leu Pro Val Gln Ala Arg Asn Lys Ala Asn Arg Val
130 135 140

Trans-Sialidasen.ST25.txt

Val Ser Met Ile Leu Tyr Ser Ala Asp Asp Gly Lys Ser Trp His Phe
 145 150 155 160
 Gly Lys Gly Glu Ala Gly Val Gly Thr Ser Glu Ala Ala Leu Thr Glu
 165 170 175
 Trp Asp Gly Lys Leu Leu Ile Ser Ala Arg Ser Asp Gly Gly Gln Gly
 180 185 190
 Tyr Arg Met Ile Phe Glu Ser Ser Asp Leu Gly Ala Thr Trp Lys Glu
 195 200 205
 Met Leu Asn Ser Ile Ser Arg Val Ile Gly Asn Ser Pro Gly Arg Ser
 210 215 220
 Gly Pro Gly Ser Ser Ser Gly Phe Ile Thr Val Thr Val Glu Gly Val
 225 230 235 240
 Pro Val Met Leu Ile Thr His Pro Lys Asn Leu Lys Gly Ser Tyr Tyr
 245 250 255
 Arg Asp Arg Leu Gln Leu Trp Met Thr Asp Gly Asn Arg Met Trp His
 260 265 270
 Val Gly Gln Val Ser Glu Gly Asp Asp Asn Ser Ala Tyr Ser Ser Leu
 275 280 285
 Leu Tyr Thr Pro Asp Gly Val Leu Tyr Cys Leu His Glu Gln Asn Ile
 290 295 300
 Asp Glu Val Tyr Ser Leu His Leu Val Arg Leu Val Asp Glu Leu Lys
 305 310 315 320
 Ser Ile Lys Ser Thr Ala Leu Val Trp Lys Ala Gln Asp Glu Leu Leu
 325 330 335
 Leu Gly Asn Cys Leu Pro Gly Asp Lys Tyr Asp Pro Gly Cys Asp Gly
 340 345 350
 Ile Pro Thr Ala Gly Leu Ala Gly Leu Leu Val Gly Pro Leu Thr Glu
 355 360 365
 Lys Thr Trp Pro Asp Ala Tyr Arg Cys Val Asn Ala Ala Thr Ser Gly
 370 375 380
 Ala Val Ser Thr Ala Glu Gly Val Arg Leu Asp Val Gly Gly Gly Gly
 385 390 395 400
 His Val Val Trp Pro Val Ser Glu Gln Gly Gln Asp Gln Arg Tyr Tyr
 405 410 415

Trans-Sialidasen.ST25.txt

Phe Thr Asn Ser Glu Phe Thr Leu Ala Val Thr Val Arg Phe Asp Glu
 420 425 430

Met Pro Arg Gly Glu Leu Pro Leu Leu Gly Phe Val Asn Arg Lys Gly
 435 440 445

Lys Val Lys Lys Ile Leu Lys Val Ser Leu Ser Gly Val Glu Trp Leu
 450 455 460

Leu Ala Tyr Gly Asn Glu Tyr Asn Ser Thr Ala Ala Glu Pro Leu Asp
 465 470 475 480

Val Asn Glu Ser His Gln Val Val Leu Ala Leu His Asp Gly Ile Val
 485 490 495

Ser

<210> 3
 <211> 831
 <212> DNA
 <213> Trypanosoma congolense

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(831)
 <223>

<400> 3
 ttc cga att ccc tca ctt gtt gag ata gac ggc gtg ctt atc gcg aca 48
 Phe Arg Ile Pro Ser Leu Val Glu Ile Asp Gly Val Leu Ile Ala Thr
 1 5 10 15
 ttc gat aca cgt tat ctt cgc gct tcc gac agc agt ctc ata gac aca 96
 Phe Asp Thr Arg Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Ser Ser Leu Ile Asp Thr
 20 25 30
 gct atg aaa tac agt gcc gat cag ggg aag acg tgg aaa act gaa atc 144
 Ala Met Lys Tyr Ser Ala Asp Gln Gly Lys Thr Trp Lys Thr Glu Ile
 35 40 45
 ata ata aaa aat gct aga cta act gat aac ttt tcc cgc gtc gtt gat 192
 Ile Ile Lys Asn Ala Arg Leu Thr Asp Asn Phe Ser Arg Val Val Asp
 50 55 60
 cca acg gtt gtt gtt aag ggt gat aac ttg ttt att ttt gtt ggg agg 240
 Pro Thr Val Val Val Lys Gly Asp Asn Leu Phe Ile Phe Val Gly Arg
 65 70 75 80
 tac aac acc tca tct gcc cca tgg gtc tgg cag gaa aac ggt aaa gac 288
 Tyr Asn Thr Ser Ser Ala Pro Trp Val Trp Gln Glu Asn Gly Lys Asp
 85 90 95
 tgg gat gta ctg ttg tac aag gcc aag gtg agg aag gaa tca gcg ggt 336
 Trp Asp Val Leu Leu Tyr Lys Ala Lys Val Arg Lys Glu Ser Ala Gly
 100 105 110
 ggg gta cca tca gtg agc ttt aca tgg gac gaa ccc cta tac ctg aag 384
 Gly Val Pro Ser Val Ser Phe Thr Trp Asp Glu Pro Leu Tyr Leu Lys
 115 120 125
 cat ctg ctc acc tct gtc ggt aaa ata gac ggc agg tcc ctc ata caa 432

Trans-Sialidasen.ST25.txt

His Leu Leu Thr Ser Val Gly Lys Ile Asp Gly Arg Ser Leu Ile Gln
 130 135 140
 tac att ggt ggc gtt gga aat ggt att gta aca ccg aaa ggt act atc 480
 Tyr Ile Gly Gly Val Gly Asn Gly Ile Val Thr Pro Lys Gly Thr Ile 160
 145 150 155
 gtg ttt cca gtt cag gtt tta aac acc aac aaa tcc gtc atg aac atg 528
 Val Phe Pro Val Gln Val Leu Asn Thr Asn Lys Ser Val Met Asn Met 175
 165 170
 ctt ctg tat tca agt aac gac gga aaa acc tgg gag ttc agc aaa act 576
 Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Asp Gly Lys Thr Trp Glu Phe Ser Lys Thr 190
 180 185
 tcc aca ccc gcg ggc aca act gag gcc tcc ctt gtt tgg tgg gat gga 624
 Ser Thr Pro Ala Gly Thr Thr Glu Ala Ser Leu Val Trp Trp Asp Gly 205
 195 200
 caa cta ctt ctc aca agc aga aca act ccg gat gtc ggc agc cgc aaa 672
 Gln Leu Leu Leu Thr Ser Arg Thr Thr Pro Asp Val Gly Ser Arg Lys 220
 210 215
 gta tat tta aca agc gac ctc gga act tca tgg aat gaa gcg atc gga 720
 Val Tyr Leu Thr Ser Asp Leu Gly Thr Ser Trp Asn Glu Ala Ile Gly 240
 225 230 235
 agt atc tct cgt gta att ggt aac tcg cgg tac cgt aac gat cct ggg 768
 Ser Ile Ser Arg Val Ile Gly Asn Ser Arg Tyr Arg Asn Asp Pro Gly 255
 245 250
 ggg tca ggt agc tca att gcc ata act gtg gag gga gta ccg gtg atg 816
 Gly Ser Gly Ser Ser Ile Ala Ile Thr Val Glu Gly Val Pro Val Met 270
 260 265
 ctg att acc cac ccg 831
 Leu Ile Thr His Pro 275

<210> 4
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> Trypanosoma congolense
 <400> 4

Phe Arg Ile Pro Ser Leu Val Glu Ile Asp Gly Val Leu Ile Ala Thr
1 5 10 15

Phe Asp Thr Arg Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Ser Ser Leu Ile Asp Thr
20 25 30

Ala Met Lys Tyr Ser Ala Asp Gln Gly Lys Thr Trp Lys Thr Glu Ile
35 40 45

Ile Ile Lys Asn Ala Arg Leu Thr Asp Asn Phe Ser Arg Val Val Asp
50 55 60

Pro Thr Val Val Val Lys Gly Asp Asn Leu Phe Ile Phe Val Gly Arg
65 70 75 80

Tyr Asn Thr Ser Ser Ala Pro Trp Val Trp Gln Glu Asn Gly Lys Asp

Trans-Sialidasen.ST25.txt

85

90

95

Trp Asp Val Leu Leu Tyr Lys Ala Lys Val Arg Lys Glu Ser Ala Gly
 100 105 110
 Gly Val Pro Ser Val Ser Phe Thr Trp Asp Glu Pro Leu Tyr Leu Lys
 115 120 125
 His Leu Leu Thr Ser Val Gly Lys Ile Asp Gly Arg Ser Leu Ile Gln
 130 135 140
 Tyr Ile Gly Gly Val Gly Asn Gly Ile Val Thr Pro Lys Gly Thr Ile
 145 150 155 160
 Val Phe Pro Val Gln Val Leu Asn Thr Asn Lys Ser Val Met Asn Met
 165 170 175
 Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Asp Gly Lys Thr Trp Glu Phe Ser Lys Thr
 180 185
 Ser Thr Pro Ala Gly Thr Thr Glu Ala Ser Leu Val Trp Trp Asp Gly
 195 200 205
 Gln Leu Leu Leu Thr Ser Arg Thr Thr Pro Asp Val Gly Ser Arg Lys
 210 215 220
 Val Tyr Leu Thr Ser Asp Leu Gly Thr Ser Trp Asn Glu Ala Ile Gly
 225 230 235 240
 Ser Ile Ser Arg Val Ile Gly Asn Ser Arg Tyr Arg Asn Asp Pro Gly
 245 250 255
 Gly Ser Gly Ser Ser Ile Ala Ile Thr Val Glu Gly Val Pro Val Met
 260 265 270
 Leu Ile Thr His Pro
 275

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/14079

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N9/10 A61K35/00 C12N5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, MEDLINE, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>PONTES DE CARVALHO LAIN C ET AL: "Characterization of a novel trans-sialidase of Trypanosoma brucei procyclic trypomastigotes and identification of procyclin as the main sialic acid acceptor" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 177, no. 2, 1993, pages 465-474, XP002276140 & ISSN: 0022-1007 the whole document</p> <p>----- -/--</p>	1-6,7-26

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 September 2004

Date of mailing of the international search report

18.10.04

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Seranski, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/14079

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MONTAGNA GEORGINA ET AL: "The trans-sialidase from the African trypanosome Trypanosoma brucei" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 269, no. 12, June 2002 (2002-06), pages 2941-2950, XP002276141 & ISSN: 0014-2956 page 2943, column 1 - page 2947, column 1; figure 2	1-6,8-11
X	the whole document	12-26
X	& DATABASE EMBL retrieved from EBI Database accession no. AF310232 70% identisch in einem 563nt überlappenden Bereich, Nt 1-23 100% identisch abstract	1-6,8-11
X	----- DATABASE EMBL XP002276142 retrieved from EBI Database accession no. AF181287 69,8% identisch in einem 563nt überlappenden Bereich, Nt 1-23 100% identisch abstract	4-6,8,9
X	----- CREMONA M L ET AL: "A single tyrosine differentiates active and inactive Trypanosoma cruzi trans-sialidases" GENE, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS. AMSTERDAM, NL, vol. 160, no. 1, 4 July 1995 (1995-07-04), pages 123-128, XP004042190 ISSN: 0378-1119 the whole document & DATABASE EMBL retrieved from EBI Database accession no. Q26968 Trans-sialidase 45,487% identisch in einem 277aa overlap zu Protein mit Seq-ID.N°4 abstract	1-6,9-26
P,X	----- TIRALONGO EVELIN ET AL: "Two trans-sialidase forms with different sialic acid transfer and sialidase activities from Trypanosoma congolense." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 278, no. 26, 27 June 2003 (2003-06-27), pages 23301-23310, XP002293242 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-6,9-26
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/14079

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>& DATABASE EMBL retrieved from EBI Database accession no. Q7YZT2 Trans-Sialidase 100% identisch zur Protein mit Seq-ID-N°4 abstract</p> <p>-----</p> <p>ENGSTLER MARKUS ET AL: "The developmentally regulated trans-sialidase from Trypanosoma brucei sialylates the procyclic acidic repetitive protein" MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY, vol. 61, no. 1, 1993, pages 1-13, XP002293243 & ISSN: 0166-6851 the whole document</p> <p>-----</p>	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 03/14079

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: **23-26 (partly)**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See supplemental sheet PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☒

No protest accompanied the payment of additional search fees.

Box II

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims 1-26 (all in part)

Polynucleotide with SEQ ID NO:1 coding for a polypeptide with SEQ ID NO:2 with trans-sialidase activity of *Trypanosoma congolense* and variants thereof, hybridising oligonucleotides, expression cassettes containing this polynucleotide, vectors, host cells, use of the expression cassettes, method for enzymatic sialisation, use for producing drugs/vaccines, effectors of trans-sialidase activity and use thereof, isolating method and pharmaceutical agent.

2. Claims 1-26 (all in part)

Polynucleotide with SEQ ID NO:3 coding for a polypeptide with SEQ ID NO:4 with trans-sialidase activity of *Trypanosoma congolense* and variants thereof, hybridising oligonucleotides, expression cassettes containing this polynucleotide, vectors, host cells, use of the expression cassettes, method for enzymatic sialisation, use for producing drugs/vaccines, effectors of trans-sialidase activity and use thereof, isolating method and pharmaceutical agent.

Box I.2

Claims 23-26 (in part)

The current claims 23 to 26 relate to an inordinately large number of possible compounds, of which only a small proportion are supported by the description (PCT Article 6) and/or can be regarded as having been disclosed in the application (PCT Article 5). In the present case the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it does not appear possible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. The search was therefore directed to the parts of the claims that appear to be supported and disclosed in the above sense, namely the parts relating to the antisense nucleic acid sequences.

The applicant is advised that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II. After entry into the regional phase before the EPO, however, an additional search can be carried out in the course of the examination (cf. EPO Guidelines, C-VI, 8.5) if the defects that led to the declaration under PCT Article 17(2) have been remedied.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/14079

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N9/10 A61K35/00 C12N5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, MEDLINE, PAJ, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>PONTES DE CARVALHO LAIN C ET AL: "Characterization of a novel trans-sialidase of Trypanosoma brucei procyclic trypomastigotes and identification of procyclin as the main sialic acid acceptor" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, Bd. 177, Nr. 2, 1993, Seiten 465-474, XP002276140 & ISSN: 0022-1007 das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">----- -/-</p>	1-6,7-26



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

16. September 2004

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

18. 10. 04

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Seranski, P

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MONTAGNA GEORGINA ET AL: "The trans-sialidase from the African trypanosome Trypanosoma brucei" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 269, Nr. 12, Juni 2002 (2002-06), Seiten 2941-2950, XP002276141 & ISSN: 0014-2956 Seite 2943, Spalte 1 - Seite 2947, Spalte 1; Abbildung 2	1-6,8-11
X	das ganze Dokument	12-26
X	& DATABASE EMBL gefunden im EBI Database accession no. AF310232 70% identisch in einem 563nt überlappenden Bereich, Nt 1-23 100% identisch Zusammenfassung	1-6,8-11
X	----- DATABASE EMBL XP002276142 gefunden im EBI Database accession no. AF181287 69,8% identisch in einem 563nt überlappenden Bereich, Nt 1-23 100% identisch Zusammenfassung	4-6,8,9
X	----- CREMONA M L ET AL: "A single tyrosine differentiates active and inactive Trypanosoma cruzi trans-sialidases" GENE, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS. AMSTERDAM, NL, Bd. 160, Nr. 1, 4. Juli 1995 (1995-07-04), Seiten 123-128, XP004042190 ISSN: 0378-1119 das ganze Dokument & DATABASE EMBL gefunden im EBI Database accession no. Q26968 Trans-sialidase 45,487% identisch in einem 277aa overlap zu Protein mit Seq-ID.N°4 Zusammenfassung	1-6,9-26
P, X	----- TIRALONGO EVELIN ET AL: "Two trans-sialidase forms with different sialic acid transfer and sialidase activities from Trypanosoma congolense." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 278, Nr. 26, 27. Juni 2003 (2003-06-27), Seiten 23301-23310, XP002293242 ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument	1-6,9-26
	----- -/-	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>& DATABASE EMBL gefunden im EBI Database accession no. Q7YZT2 Trans-Sialidase 100% identisch zur Protein mit Seq-ID-N°4 Zusammenfassung</p> <p>-----</p> <p>ENGSTLER MARKUS ET AL: "The developmentally regulated trans-sialidase from Trypanosoma brucei sialylates the procyclic acidic repetitive protein" MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY, Bd. 61, Nr. 1, 1993, Seiten 1-13, XP002293243 & ISSN: 0166-6851 das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-26

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. ☒ Ansprüche Nr. 23-26 (teilweise)
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe BEIBLATT PCT/ISA/210

3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese Internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☒ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☒ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-26 (alle teilweise)

Polynukleotid mit Seq-ID-N°1 kodierend für Polypeptid mit Seq-ID-N°2 mit Trans-Sialidase-Aktivität aus Trypanosoma congolense sowie Varianten davon, hybridisierende Oligonukleotide, Expressionskassetten beinhaltend diese Polynukleotide, Vektoren, Wirtszellen, Verwendung der Expressionskassetten, Verfahren zur enzymatischen Sialisierung, Verwendung zur Herstellung von Medikamenten/Impfstoffen, Effektoren der Trans-Sialidase Aktivität und deren Verwendung, Verfahren zur Isolierung sowie pharmazeutische Mittel.

2. Ansprüche: 1-26 (alle teilweise)

Polynukleotide mit Seq-ID-N°3 kodierend für Polypeptid mit Seq-ID-N°4 mit Trans-Sialidase-Aktivität aus Trypanosoma congolense sowie Varianten davon, hybridisierende Oligonukleotide, Expressionskassetten beinhaltend diese Polynukleotide, Vektoren, Wirtszellen, Verwendung der Expressionskassetten, Verfahren zur enzymatischen Sialisierung, Verwendung zur Herstellung von Medikamenten/Impfstoffen, Effektoren der Trans-Sialidase Aktivität und deren Verwendung, Verfahren zur Isolierung sowie pharmazeutische Mittel.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 23-26 (teilweise)

Die geltenden Patentansprüche 23-26 beziehen sich auf eine unverhältnismässig grosse Zahl möglicher Verbindungen/, von denen sich nur ein kleiner Anteil im Sinne von Artikels 6 PCT auf die Beschreibung stützen und/oder als im Sinne von Artikels 5 PCT in der Patentanmeldung offenbart gelten kann. Im vorliegenden Fall fehlt den Patentansprüchen die entsprechende Stütze und fehlt der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Masse, dass eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als gestützt und offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend, die Antisense-Nukleinsäuresequenzen.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, dass Patentansprüche auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit, der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, dass die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, dass der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäss Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt. Nach Eintritt in die regionale Phase vor dem EPA kann jedoch im Zuge der Prüfung eine weitere Recherche durchgeführt werden (Vgl. EPA-Richtlinien C-VI, 8.5), sollten die Mängel behoben sein, die zu der Erklärung gemäss Art. 17 (2) PCT geführt haben.